

TRAITEMENT DE LA COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 09 février 2000 (09.02.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/01343	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98032 PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 juin 1999 (08.06.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 10 juin 1998 (10.06.98)
Déposant PIERRARD, Jérôme etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

06 janvier 2000 (06.01.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Diana Nissen
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

09/719017.
T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH 98032 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01343	International filing date (day/month/year) 08 June 1999 (08.06.99)	Priority date (day/month/year) 10 June 1998 (10.06.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/55		
Applicant AVENTIS ANIMAL NUTRITION S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>11</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 06 January 2000 (06.01.00)	Date of completion of this report 19 September 2000 (19.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01343

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-20, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01343

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See separate sheet.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/01343

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Pages 1-4 of the listing of sequences nos. 1-4 filed on 1 July 1999, do not form part of the application (PCT Rule 13ter.1(f)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/01343

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

Claims 1-18 concern an industrial method for preparing heterologous proteins in a strain of *E.coli* W. Claims 19-20 concern a strain of *E.coli* W, characterised in that it comprises an expression system for heterologous proteins in which the promoter is the promoter P_{trp} .

Independent Claims 1 and 19 are not so linked as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1), for the following reasons:

The technical features of said claims, i.e. a strain of *E.coli* W and an expression system for heterologous proteins as well as a combination thereof (see Box V, point 2) are already known and do not involve an inventive step. Therefore the unity of invention requirement (PCT Rule 13.1) has not been fulfilled inasmuch as there is no technical relationship between the independent claims pertaining to one or more "special technical features" under the terms of PCT Rule 13.2.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/01343

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	5-6, 9, 12-15, 18-20	YES
	Claims	1-4, 7-8, 10-11, 16-17	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-20	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: LEE S Y AND CHANG H N: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, September 1993 (1993-09), pages 971-974, cited in the application

D2: EP-A-0 596 812 (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 May 1994 (1994-05-11) cited in the application

D3: LEE J ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 59-62

D4: EP-A-0 496 993 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 August 1992 (1992-08-05)

D5: WO-A-90/02193 (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L O; CONWAY T; ALTERTHUM F) 8 March 1990 (1990-03-08)

D6: WO-A-98/18941 (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 May 1998 (1998-05-07)

D7: WO-A-90/02800 (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 mars 1990 (1990-03-22)

D8: CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 November 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVCIC, BRANKA ET AL.: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968,

D9: FR-A-2 128 587 (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)), 20 October 1972 (1972-10-20)

D10: US-A-5 000 000 (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L O; CONWAY T; ALTERTHUM F) 19 March 1991 (1991-03-19)

D11: US-A-5 354 667 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 October 1994 (1994-10-11)

D12: US-A-4 246 346 (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P-O; MOSBACH K H, OHLSON S A) 20 January 1981 (1981-01-20)

Introduction

The application discloses a method for preparing heterologous proteins in *E.coli* W and in corresponding strains.

1) Novelty (PCT Article 33(1) and 33(2))

Claims 1-3 are not novel over document **D4**. An expression system for a heterologous protein (GI-7-ACA cyclase) is used in the *E.coli* strain W ATTC 9637 (Example 9, page 14, lines 26-27 and 51, and Claim 4). In addition, a derivative of the *E.coli* strain W ATTC 9637 is obtained by clonal selection and genetic manipulation (page 14,

lines 49-50).

Claim 4 is not novel over D4. A high heterologous protein content (page 15, line 4) and a high biomass density (page 15, lines 29-32) are obtained.

Claims 7 and 8 are not novel since document D4 mentions the use of saccharose for preparing the culture medium (page 8, line 44). In addition, the *E.coli* W strain ATTC 9637 is well known for its capacity to use sucrose **D5** (page 6, lines 33-36), **D1** (page 971, introduction), **D10** (column 6, lines 49-53).

Claims 10 and 11 are not novel over D4. Sources of nitrogen such as the yeast extracts are mentioned therein (page 15, line 23).

Claims 16-17 are not novel since the GI-7-ACA acylase, described in document D4, is an enzyme (e.g. page 9, line 16).

2) **Inventive step (PCT Article 33(1) and 33(3))**

Claims 5-6 are novel but not inventive. The tryptophan promoter is known from the prior art (**D2**: page 11, line 24 and **D6**: page 25, line 5) and in these cases the tryptophan is added to the medium (**D2**: page 11, line 42 and **D6**: page 25, line 11). Usually 0.1 g/l of tryptophan is added. Since the description does not mention that the concentrations of tryptophan given in Claim 6 offer any type of advantage, this claim does not involve an inventive step.

Claim 9 appears to be novel since document D4 does not mention a specific amount, but it is not inventive since documents **D1**, **D3** and **D5** indicate the amounts, 20 g/l (page 972, materials and methods), 15 g/l (materials and

methods) and 2% (page 19, line 43), respectively, added to the *E.coli* W ATTC 9637 culture medium.

Claims 12-13 are novel, but do not involve an inventive step since the meat proteins or the peptones are very often envisaged as alternatives to other nitrogen sources (**D11**: column 8, line 53, **D9**: page 7, line 15, **D12**: column 3, line 16 and Table II). In particular, in **D8** the *E.coli* W strain ATTC 9637 has increased growth in the presence of peptones. In addition, the concentration ranges given in Claim 12 are so broad that they are covered by common organic nitrogen sources such as peptones, yeast extracts, etc.

Claims 14-15 and 19-20 are novel, but do not involve an inventive step since document **D7** (page 13, paragraph 3) describes a sequence that is 93.4% identical to that described in the application. In particular, the sequences of the promoter P_{trp} and of the ribosomal-binding site of the *cII* gene of the phage appear to have been completely conserved. Therefore the act of combining the P_{trp} promoter with the *E.coli* W strain is obvious in the light of documents D4 and D7.

Claim 18 is novel but does not involve an inventive step over D2 and D6 in combination with D4. Documents D2 (page 11, line 24) and D6 (page 25, line 5) concern nitrilase expression under the control of a tryptophan promoter in *E.coli* TG1 (D2: Example 5) and DH5 α (D6: Example 5). Selection of the *E.coli* W strain ATTC 9637 for its sucrose-using capacity is well known from D5 (page 6, lines 33-36), D1 (page 971, introduction), D10 (column 6, lines 49-53), while other *E.coli* W strains currently used cannot use sucrose (e.g. D5: page 20, line 9).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

- a. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1 (a) (ii), the description does not outline the relevant prior art disclosed in documents D3-D5, D7 and D12 and does not cite said documents.
- b. The definition of the expression "heterologous protein" is unclear. The phrase (page 7, lines 31-33) "or even of a naturally produced protein... regulation elements separate from those of the expression system of the invention" contradicts the phrase (page 7, lines 25-27) "by heterologous protein, ... is intended" stating that a heterologous protein is a protein that cannot be naturally found in *E.coli* W. In addition, if the expression of the heterologous protein is controlled by regulation elements that are separate from the expression system of the invention, the description goes beyond that which is claimed (PCT Article 5).
- c. The phrase "the genes, of which the coexpression promotes... are comprised in the expression system of the invention" (page 7, lines 22-24) appears to suggest that the description goes beyond the claims, by introducing an inadequately defined feature, thus causing the description to be obscure (PCT Article 5).
- d. It is not clear to which documents the description refers as regards "CIP application no. 08/194 588 (page 7, line 13) and "application FR96/13077" (page 9, lines 29-31). Consequently, some of the features of the invention are unclear and it cannot

VII. Certain defects in the international application

- be determined whether the invention can be carried out by a person skilled in the art (PCT Article 5).
- e. The phrases "expression cultures have been created as described in Example 5..." (page 10, line 22) and "the measurements of nitrilase activity... as described..." (page 10, line 27) refer to other documents for the culture conditions and the measurements of nitrilase activity. Similarly "the measurements of polyamide hydrolase activity... as described in application WO 97/04083..." refers to another document for the measurements of polyamide hydrolase activity. Since the application should be understandable *per se*, the conditions cannot be introduced by reference to other documents, they should be specified (PCT Article 5).
- f. Some plasmids, pXL2035 (page 10, line 19), pRPG9 and pSL301 (Example 11, pages 20-21), pRPA-BCAT37 (page 23, line 25), RSF1010D20 (page 23, line 27), for example, are described only by reference to other documents. Said plasmids are not adequately described for the application to be understandable *per se* (PCT Article 5).
- g. Table 6 (page 22) compares two different strains: DH5 α and W. It is therefore not clear how the use of the *cer* locus can improve the yield (PCT Article 5).
- h. Strain L21 is not defined, rendering the description obscure (PCT Article 5).
- i. The expression "preferably" in Claims 5 and 9 indicates that the features "between 0.1 and

VII. Certain defects in the international application

0.3 g/l" and "between 0.5 and 200 g/l" respectively, are entirely optional. Similarly, the expression "in particular" in Claim 13, indicates that the feature "the potato protein derivatives" is entirely optional (cf. PCT Guidelines Ch. III, 4.6).

- j. The expression "appropriate additives" in paragraph 2, page 6 is unclear since any additive can be considered, rendering the scope of the invention imprecise (PCT Article 5).
- k. If, for example polymerase pfu (page 23, lines 18-19) and Quiaex (page 25, line 18) are registered trademarks, the fact that they are not recognised as such renders the description obscure (cf. PCT Guidelines Ch. III, 4.16).
- l. The abbreviation HMTBA (Table 1, page 11) is not defined in the description, rendering said description obscure (PCT Article 5).
- m. In the French original, the terms "reorésente" (page 8, line 31), D20 (page 9, line 6) "est" (page 6, line 32), figure 2 (page 26, line 16), "contant" (page 9, line 27) are unclear and render the description obscure (PCT Article 5).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- a. It is clear from the description and Claim 19 that the use of a P_{trp} promoter is essential to the definition of the invention. Since independent Claim 1 does not contain said feature, said claim does not fulfil the requirements of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3(b), which stipulates that an independent claim should contain all the technical features essential for the definition of the invention.
- b. The P_{trp} promoter is not defined in Claim 14 and in the description (e.g. page 7, line 6). Since the origin of said promoter is not specified, Claim 14 and the description are unclear (PCT Article 5 and 6).
- c. Since the term "strong", used in Claim 4, is relative, it casts doubt on the meaning of the technical features to which it refers. The subject matter of said claim is therefore not clearly defined (PCT Article 6 and PCT Guidelines Ch. III, 4.5a).

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 47/48	A2	(11) International Publication Number: WO 99/21586 (43) International Publication Date: 6 May 1999 (06.05.99)
(21) International Application Number: PCT/EP98/06864 (22) International Filing Date: 29 October 1998 (29.10.98) (30) Priority Data: PV97A000009 29 October 1997 (29.10.97) IT (71) Applicant (for all designated States except US): EURAND INTERNATIONAL S.P.A. [IT/IT]; Piazzale Marengo, 8, I-20121 Milan (IT). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): CAMELLA, Carla, Marcella [IT/IT]; Viale Sardegna, 100, I-27100 Pavia (IT). BONFERONI, Maria, Cristina [IT/IT]; Via Riviera, 85, I-27100 Pavia (IT). (74) Agent: GERVASI, Gemma; Notarbartolo & Gervasi S.p.A., Corso di Porta Vittoria, 9, I-20122 Milan (IT).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
(54) Title: COMPLEX BETWEEN CARRAGEENAN AND A WATER SOLUBLE DRUG HAVING A SPECIFIC GRANULOMETRY AND RELATIVE CONTROLLED RELEASE PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS (57) Abstract A complex between carrageenan and a water soluble drug characterised in powder form having an average particle size comprised between 10 and 100 μ m, and the basic water drug is contained in the complex in amounts ranging from 1.5 and 5 mmol/g carrageenan, a process for preparing this complex and relative controlled release pharmaceutical compositions containing it.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

COMPLEX BETWEEN CARRAGEENAN AND A WATER SOLUBLE DRUG
HAVING A SPECIFIC GRANULOMETRY AND RELATIVE CONTROLLED
RELEASE PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

Field of the invention

- 5 The present invention relates to a complex between a water soluble drug and carrageenan in powder form characterised in that this powder has a specific granulometry, a process for preparing this complex and controlled release pharmaceutical composition containing said complex.

Prior art disclosure

- 10 One of the simplest and cheapest methods to obtain the prolonged release of drugs is the use of tablets containing the drug and one or more polymers quite often able to gelify. Especially in the case of very soluble drugs, however, the release rate is higher at the beginning of the dissolution and decreases with the increase in diffusional pathway. This can result in strong variations of plasma
15 levels especially in the case of drugs administered at high dosages.

Solid oral dosage forms based on ion exchangers are described in the literature. Ionic exchange resins and hydrophilic polymers with ionisable groups have been used. Most of the commonly used drugs, being basic in nature, can interact with polymer acidic groups (carboxylic or sulfonic groups). The sulfonic polymers,
20 being stronger acids, are likely to interact with the drug independently of the pH of the medium. In any case, the ionic interaction between the drug and the polymer gives as a result a change of the release profiles of the drug. In particular, with some drugs a precipitation of the complex may occur.

Drug-carrageenan complexes have been proposed for the sustained release in
25 parenteral administration (intramuscular) (H.D. Graham et al, J. Pharm. Sci, 52,1963,193-198).

Moreover, complexes of carrageenan with some drugs (emepronium, doxycycline and propranolol) and with antidepressant drugs have been proposed to reduce the risks of overdosing the drug (WO 93/07860, 1993).

- 30 An ofloxacin-carrageenan complex has also been proposed to prepare sustained release tablets, whose release was completed in 2-3 hours (JP 61 130239, 1986).

In the methods of complex preparation described in the literature at least one of the interacting species is present in solution; in some cases polymer solutions concentrated at 5% w/v are used (JP 60 174729).

However, in the preparation of solid oral dosage forms (tablets, pills, capsules, granulates), no particular attention has been given, until now, to the particle size of the complex, and quite often high amounts of other excipients have been used to obtain coherent tablets or to slow down the release rate.

Controlled release tablets have many advantages from the technological point of view and for the patient compliance. A thorough formulation study is however necessary to obtain the desired release rate and profile also taking into account the characteristics, for example the pH, of the dissolution medium. When high dosages of a freely soluble drug are needed, this task is rendered more difficult since the quantity of polymers and other excipients to be added to modulate the release must be limited, in order to avoid the preparation of tablets of big dimensions.

Technical problem

The need was felt to have controlled release therapeutical compositions not containing high amounts of polymers and excipients and therefore being of acceptable dimensions for the oral administration.

Summary of the invention

The present invention relates to a complex of carrageenan with a water soluble drug in powder form with an average particle size ranging from 10 to 100 μ and the basic water soluble drug is contained in the complex in amounts ranging from 1.5 and 5 mmol/g carrageenan.

The Applicant has in fact surprisingly found that by using the carrageenan complex with the average particle size in the above mentioned range it is possible to prepare controlled release pharmaceutical compositions not suffering from the drawbacks of the above mentioned known controlled release pharmaceutical compositions containing the carrag enan complex.

In fact by using the carrageenan complex according to the present invention it is possible to prepare controlled release pharmaceutical compositions without the

need to add high quantities of further excipients or polymers able to further slow down the drug release.

The present invention therefore further relates to controlled release pharmaceutical compositions containing the complex according to the present invention.

The invention also concerns a process for preparing the complex, based on the interaction between polymer and drug when a minimum amount of water is added, therefore unlikely the known processes above reported, it does not require a previous dissolution of the carrageenan and/or the drug in water.

In particular this process according to the present invention comprises the following steps:

- a) preparing a homogeneous mixture of drug and carrageenan in suitable quantities in order to obtain a final carrageenan complex wherein the drug is contained amounts comprised between 1.5 and 5 mmol/g carrageenan
- b) kneading the mixture in a suitable apparatus by adding a water content expressed as weight ratio water /polymer + water soluble basic substance comprised between 1:3 and 3: 1
- c) optionally washing the product coming from step (b);
- d) drying the mixture.
- e) milling the dried product until reaching the desired particle size.

The advantages of the process according to the present invention which does not require a previous solubilization step can be summarised as follows:

- the recovery of the complex is much easier than in the prior art processes using high volumes of solvent;
- process times are decidedly shorter;
- the centrifugation or filtration step of highly viscous carrageenan solution to recover the desired complex is no longer strictly necessary.

Description of the figures

Figure 1 reports the release profiles at pH 1.2 and pH 6.8 of the tablet prepared as described in Example 7 with the complex of carrageenan with diltiazem•HCl, wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in

hour is reported in abscissae.

Figure 2-A reports the release profiles at pH 1.2 of the tablet prepared as described in Example 3 (109) and the tablet prepared as described in Example 2 (209) having a sieve fraction $<45\mu\text{m}$, wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in hour is reported in abscissae.

Figure 2-B reports the release profiles at pH 6.8 of the tablet prepared as described in Example 3 and the tablet prepared as described in Example 2 (209), having a sieve fraction $<45\mu\text{m}$, wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in hour is reported in abscissae.

Figure 3-A reports the release profile at pH 1.2 and 6.8 of the tablet prepared as described in Example 2 prepared with the complex of carrageenan with diltiazem•HCl, having a particle size 75-105 μm , wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in hour is reported in abscissae.

Figure 3-B reports the release profile at pH 1.2 and 6.8 of the tablet prepared as described in Example 2 prepared with the complex of carrageenan with diltiazem, having a particle size 45-75 μm , wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in hour is reported in abscissae.

Figure 3C reports the release profile at pH 1.2 and 6.8 of the tablet prepared as described in Example 2 with the complex of carrageenan with diltiazem having a particle size $<45\mu\text{m}$, wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in hour is reported in abscissae.

Figure 4-A reports the release profile at pH 1.2 of the tablet prepared as disclosed in Example 6 with the complex of carrageenan with propranolol having a particle size either 45-75 μm or $<45\mu\text{m}$, wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in hour is reported in abscissae.

Figure 4-B reports the release profile at pH 7.5 of the tablet prepared as disclosed in Example 6 with the complex of carrageenan with propranolol having either a particle size 45-75 μm or $<45\mu\text{m}$, wherein the percentage of drug release is reported in ordinates and the time in hour is reported in abscissae.

Figure 5 reports the release profile carried out in the dissolution test conducted with a pH change after 3 hours from dissolution of tablets whose preparation is

disclosed in Example 8 having surface/volume ratio R of 0.7 and 0.9 .

Detailed description of the invention

As previously pointed out the Applicant has found that the granulometric range of the complex according to the present invention is critical in order to obtain a controlled drug release. In fact with pharmaceutical composition essentially based on the carrageenan complex with a particle size higher than 100 μm it is not possible to modulate the drug release, since the drug is very quickly released, by contrast using a pharmaceutical composition containing as the essential component a complex having an average granulometry below 10 μm , the drug release is very slow and moreover the milling, to obtain this very fine granulometry, is tedious and rather expensive.

The Applicant has in any case found that better results can be achieved by using carrageenan complexes having a particle size comprised between 45 and 75 μm and < 45 μm .

The content of the basic water soluble drug is preferably contained in amounts in the complex ranging from 3.0 to 4.0 mmol/g.

The basic water soluble drug is preferably selected from the group consisting of analgesics, antiparkinsonians, anti-inflammatory agents, anaesthetics, antimicrobials, antimalarics, antiparasitics, anticonvulsivants, CNS drugs, diuretics, hypnotics, tranquillisers, sedatives, muscle relaxants, hormones, contraceptives, sympathomimetics, hypoglycemic agents, ophthalmics, cardiovasculars.

According to a preferred embodiment in the complex according the present invention the basic drug is selected from the group consisting of: diltiazem, promethazine, salbutamol, chlorpheniramine, propranolol and/or pharmaceutically acceptable salts thereof.

According to a particularly preferred embodiment the basic drug is selected from the group consisting of: diltiazem HCl, promethazine HCl, salbutamol sulphate, chlorpheniramine maleate.

The carrageenan to be used may be indifferently the iota kappa or lambda type, although better results are obtained by using lambda carrageenan.

The carrageenan in the complex according to the present invention has preferably a viscosity comprised between 500 and 2000 cPs, more preferably has a viscosity ranging from 700 to 1600 cPs measured at 37°C with a shear rate of 20 s exp(-1). According to a particularly preferred embodiment carrageenan is used available in
5 the market with the trademark Viscarin® GP 209 having a viscosity of 1598 cPs. measured at 37°C with a shear rate of 20 s exp(-1).

The controlled release pharmaceutical compositions according to the present invention contain the complex according to the present invention in amounts ranging from 60 to 100%, more preferably in amounts ranging from 80 to 100%
10 by weight based on the total composition weight.

The controlled release pharmaceutical compositions according to the present invention show a further advantage since their drug release is independent from the pH of the medium.

The employment of the complex at a well defined particle size (under 100 µm)
15 allows to prepare controlled release tablets containing up to 90-100% complex, and therefore 60-80 % of drug (depending on the maximum binding capacity of the polymer and on the molecular weight of the drug). These tablets can therefore be exploited also in case of high drug dosages, such as those necessary for once-a-day administration.

20 The controlled release may optionally contain up to 5%, preferably between 1 and 4% by weight based on the total composition weight of a gellable polymer selected from the group consisting of hydroxypropylmethylcellulose hydroxypropylcellulose having a viscosity comprised between 4000 and 100,000 cPs, in order to further modulate the drug release.

25 The controlled release pharmaceutical composition according to the present invention may be in the form of tablets, pellets and granules. The pellets or granules can be used for the preparation of extemporaneous aqueous suspension, or may be contained in hard or soft capsules.

According to a preferred embodiment the controlled release pharmaceutical
30 compositions are preferably in the form of tablets. The employment of small particle size fractions (45-75 µm or < 45 µm) reduces the release rate, also from

tablets made with the complex alone, to values that are suitable for once a day administration, meaning a release completed within 20-24h. Moreover, it has been shown that almost linear release profiles and at any rate a marked reduction in burst effect, quite independently of medium pH, can be achieved.

5 These tablets may be prepared by direct compression of the complex powder or by compression of granules obtained by wet granulation with the process disclosed later on for the preparation of granules. The flow properties of fine fractions may render the granulation step and the addition of glidants (such as talc) to the granulate necessary; a composition useful for this kind of procedure is
10 described in Example 7: hydroxypropylmethylcellulose (5% Methocel K4M mixed to the complex and 2-3% Methocel E15 dissolved in the binding solution) has been used. The release profiles obtained with this formulation are given in Figure 1. The release occurs at approximately constant rate during about 20 h both in pH 1.2 (gastric) and in pH 6.8 (intestinal) buffers.

15 The Applicant has also surprisingly found that the tablets having the ratio surface/volume R comprised between 0.7 and 0.9 are preferred as concerns the controlled release profiles.

The pellets have preferably an average particle size ranging from 1 to 3 mm and the granules have an average particle size ranging from 0.2 to 1 mm. Both
20 granules and pellets are prepared by using conventional techniques encompassing the following steps:

- (i) kneading the carrageenan complex powder according to the present invention with an alcoholic solvent in the presence of a binder such as ethyl or methylcellulose having a viscosity ranging from 10 to 100 cPs,
- 25 (ii) granulating the kneaded mixture in a suitable granulator such as a rotogranulator,
- (iii) drying the wet granules or pellets,
- (iv) classification of the granules to separate the granules or pellets having the desired average particle size.

30 The present invention further relates to controlled release pharmaceutical composition in the form of a tablet containing a:

A) a core

B) an external layer completely or partially covering the core tablet containing the carrageenan complex with the basic water soluble drug according to the present invention, said external layer being applied by compression.

- 5 Preferably this external layer contains the complex according to the present invention in amounts ranging from 60 to 100%, preferably in amounts ranging from 80 to 100%.

It may optionally contain up to 5%, preferably between 1 and 4% by weight based on the total composition weight of a gellable polymer selected from the group
10 consisting of hydroxypropylmethylcellulose having a viscosity comprised between 4000 and 100,000 cPs., in order to further modulate the drug release.

In step (b) of the process according the present invention the water to be added expressed as weight ratio water /polymer + water soluble basic substance is preferably comprised between 1:2 and 2 : 1.

- 15 The following examples of preparation of the complex according to the present invention are reported for illustrative, but not limitative purposes.

Example 1

100 g of carrageenan (Viscarin GP 209, FMC) and 128 g of promethazine•HCl are mixed in a turbula mixer. The minimum amount of water necessary to knead the
20 mixture is added (about 100 ml). The complex is separated by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes, and washed with distilled water. The solid product is lined in trays, dried in oven at 40-50 °C overnight and milled.

Example 2

1000 g of carrageenan (Viscarin GP 209, FMC) and 1000 g of diltiazem•HCl are
25 mixed in a turbula mixer. The minimum amount of water necessary to knead the mixture is added (about 1000 ml). The complex is separated by centrifugation, and washed with distilled water. The solid product is lined in trays, dried in oven at 40-50 °C overnight and milled. The sieve fractions 45-75 µm and 75-105 µm and < 45 µm are obtained. 300 mg weight tablets, each containing about 180 mg of
30 diltiazem•HCl, are prepared by means of an hydraulic press Perkin Elmer, at 3 tons (1 minute) with 10 mm diameter flat punches .



Example 3

1000 g of low viscosity carrageenan (Viscarin GP 109, FMC) and 1600 g of diltiazem•HCl are mixed in turbula mixer. The minimum amount of water necessary to knead the mixture is added (about 1000 ml). The complex is
5 separated by centrifugation, and washed with distilled water. The solid product is lined in trays, dried in oven at 40-50 °C overnight and milled and sieved in order to recover the fraction having particle size <45microns. 300 mg weight tablets are prepared, each containing about 180 mg of diltiazem•HCl, by means of an hydraulic press Perkin Elmer, at 3 tons (1 minute) with 10 mm diameter flat
10 punches.

Example 4

100 g of carrageenan (Viscarin GP 209, FMC) and 45 g of salbutamol sulphate are mixed in a turbula mixer. About 200 ml of water are added to the mixture, that is kneaded until achieving a homogeneous mixture. The complex is lined in trays,
15 dried in oven at 40-50 °C overnight and milled up to the desired granulometry.

Example 5

100 g of carrageenan (Viscarin GP 209, FMC) and 75 g of chlorpheniramine maleate are mixed in turbula mixer. About 150 ml of water are added to the mixture, that is kneaded until achieving a homogeneous mixture. The complex is
20 lined in trays, dried in oven at 40-50 °C overnight and milled up to the desired granulometry.

Example 6

1000 g of carrageenan (Viscarin GP 209, FMC) and 1600 g of propranolol are mixed in a turbula mixer. The minimum amount of water necessary to knead the
25 mixture is added (about 1000 ml). The complex is separated by centrifugation, and washed with distilled water. The solid product is lined in trays, dried in oven at 40-50 °C overnight and milled. The sieve fractions 45-75 µm and 75-105 µm are obtained. 300 mg weight tablets, containing about 150 mg propranolol, are obtained by means of an hydraulic press Perkin Elmer, at 3 tons (1 minute) with 10 mm
30 diameter flat punches.

Example 7

From the complex obtained as described in the example 2, the $< 45 \mu\text{m}$ sieve fraction is obtained. A mixture containing 95% of this fraction and 5% of HPMC Methocel K4M is granulated by wetting with a solution of HPMC Methocel E15 and extrusion through $700 \mu\text{m}$ sieve, and is dried in oven. The granulate is forced through a $700 \mu\text{m}$ sieve again and 2% talc is added. Respectively 300 mg tablets, containing about 180 mg of diltiazem-HCl, are obtained by means of an alternative Kilian KIS tableting machine, with convex 11 mm punches.

EXAMPLE 8

From the granulate prepared as described in Example 7, 570 mg tablets containing 300 mg diltiazem-HCl were obtained with a Kilian KIS tableting reciprocating machine equipped with either 11 mm convex punches with surface/volume ratio $R = 0.7$ or 13 mm flat punches (surface/volume ratio $R = 0.9$).

METHODS FOR CARRYING OUT THE TESTS OF DRUG RELEASE IN VITRO

The release test of some of the tablets prepared according to the above reported examples was performed in a 1 basket USP XXIII apparatus at 100 rpm 37°C using either a 500 or 1000 ml fluid. The following tests had been conducted

- A) The test at pH 1.2 simulating the gastric fluid(USPXIII without enzymes).
- B) The test carried out at pH 6.8 and 7.5 simulating the intestinal fluid .
- C) The test carried out changing the pH from 1.0 to 6.8 (0.1 M HCl to 6.8 by adding Na_3PO_4 0.2M) after 3 hours from dissolution.

RESULTS

The results of the above tests are reported in Figure1, Figures 2A, 2B, Figures 3A-3B, 3-C, Figures 4A-4B, Figure 5.

In particular Figure 1 reports the results of test A and B carried out on tablets whose preparation is disclosed in Example 7 containing therefore besides the carrageenan complex with diltiazem-HCl having a particle size lower than $45\mu\text{m}$ also small amounts of talc and hydroxypropylmethylcellulose. As one can observe from this figure there is no substantial variation between the release at pH 1.2 and pH 6.8. This means that the tablets prepared according to example 7 are insensible to the pH medium and the release of the drug is complete at both the above mentioned pH after 20 hours from dissolution.

Figure 2A reports the drug release profile at pH 1.2 of tablets obtained according to Example 3 consisting of a complex between Diltiazem•HCl and carrageenan VISCARIN® GP 109 having a viscosity of 761cPs measured at 37°C with a shear rate of 20 s^{-1} and compared with tablets prepared as described in Example 2 with the complex between Diltiazem•HCl having a particle size $<45\mu\text{m}$ and carrageenan (VISCARIN® GP 209) having a viscosity of 1598 cPs, wherein it results that at low pH the Diltiazem .HCl complex with carrageenan with higher viscosity have a similar release profile if compared with the corresponding one with lower viscosity, although a little better results are obtained with the complex whose carrageenan has a low viscosity.

Figure 2 B reports the drug release profile at pH 6.8 of tablets obtained according to Example 3 obtained by a complex between Diltiazem•HCl and carrageenan VISCARIN ® GP 109 having a viscosity of 761cPs calculated at 37°C with a shear rate of 20 s^{-1} and compared with tablets prepared as described in Example 2 with the complex between Diltiazem•HCl having a particle size $<45\mu\text{m}$ and carrageenan (VISCARIN®209) having a viscosity of 1598 cPs, wherein it results that at pH 6.8 the complex with carrageenan having higher viscosity gives good results, by contrast in the complex prepared with carrageenan having lower viscosity the release is very slow and after 20 hours only 20% of the drug is released.

Figure 3A -3C reports the drug release profile at pH 1.2 and 6.8 as a function of granulometry wherein it results that for the carrageenan complex with diltiazem•HCl having a granulometry comprised between 75 and $105 \mu\text{m}$ only at pH 1.2 it is possible to control in some way the release of the drug. In fact the drug is completely released after 8 hours. By contrast at pH 6.8 the same complex completely releases the drug in about 90 minutes. With complexes having granulometry comprised between 45 and $75\mu\text{m}$ but also $<45 \mu\text{m}$ both at pH 1.2 and at pH 6.8 it is possible to slow down the diltiazem release up to 20 hours from dissolution.

Comparable results may be achieved with complexes between propranol and carrageenan reported in Figure 4A and 4(B), although better results can be

achieved with the complex fraction whose granulometry is $<45\mu\text{m}$ at both pH .

Figure 5 demonstrates that good results are obtained with tablets having the ratio surface/volume R comprised between 0.7 and 0.9 although better results are obtained with the tablets having this ratio $R = 0.7$, since the release is complet d

5 in 24 hours.

CLAIMS

- 1 1. A complex of carrageenan with a water soluble drug in powder form with an
2 average particle size ranging from 10 to 100 μ and the basic water soluble drug
3 is contained in the complex in amounts ranging from 1.5 and 5 mmol/g
4 carrageenan.
- 1 2. The carrageenan complex according to claim 1 having an average particle size
2 <45 μ m.
- 1 3. The carrageenan complex according to claim 1 having a particle size comprised
2 between 45 and 75 μ m.
- 1 4. The complex according to any one of claims 1-3 wherein the basic water
2 soluble drug is preferably contained in amounts ranging from 3.0 to 4.0 mmol/g.
- 1 5. The complex according to anyone of claims 1-4 wherein the basic water soluble
2 drug is preferably selected from the group consisting of analgesics,
3 antiparkinsonians, anti-inflammatory agents, anesthetics, antimicrobials,
4 antimalarics, antiparasitics, anticonvulsivants, CNS drugs, diuretics, hypnotics,
5 tranquillisers, sedatives, muscle relaxants, hormones, contraceptives,
6 sympathomimetics, hypoglycemic agents, ophthalmics, cardiovasculars.
- 1 6. The complex according to anyone of claims 1-5 wherein basic drug is selected
2 from the group consisting of: diltiazem, promethazine, salbutamol,
3 chlorpheniramine and /or pharmaceutically acceptable salts thereof.
- 1 7. The complex according to anyone of claims 1- 6 wherein the carrageenan has a
2 viscosity comprised between 500 and 2000 cPs. measured at 37°C with a shear
3 rate of 20 s exp(-1).
- 1 8. The complex according to claim 7 wherein the carrageenan has a viscosity
2 ranging from 700 to 1600 cPs., measured at 37°C with a shear rate of 20 s exp(-
3 1).
- 1 9. The complex according to claim 7 wherein the carrageenan has a viscosity of
2 1598 cPs measured at 37°C with a shear rate of 20 s exp(-1).
- 1 10. The complex according to anyone of claims 1-9 wherein the carrageenan is of
2 lambda type.
- 1 11. A process for preparing the complex according to anyone of claims 1-10,

2 comprising the following steps:

- 3 a) preparing a homogeneous mixture of drug and carrageenan in suitable
4 quantities in order to obtain a final carrageenan complex wherein the drug is
5 contained amounts comprised between 1,5 and 5 mmol/g carrageenan;
6 b) kneading the mixture in an suitable apparatus by adding a water content
7 expressed as weight ratio water /polymer + water soluble basic substance
8 comprised between 1:3 and 3: 1,
9 c) optionally washing the product coming from step (b);
10 d) drying the mixture,
11 e) milling the dried product until reaching the desired particle size.

1 12. The process according to claim 11 wherein in step (b) the water to be added
2 expressed as weight ratio water /polymer + water soluble basic substance is
3 comprised between 1:2 and 2:1.

1 13. A controlled release pharmaceutical composition comprising the complex
2 according to anyone of claims 1-10.

1 14. The controlled release pharmaceutical composition according to claim 13
2 wherein the complex is contained in amounts ranging from 60 to 100% by weight
3 based on the total composition weight.

1 15. The controlled release pharmaceutical composition according to anyone of
2 claims 13 and 14 wherein the complex is contained in amounts ranging from 80
3 to 100% by weight based on the total composition weight.

1 16. The controlled release pharmaceutical composition according to anyone of
2 claims 12 -14, optionally containing up to 5% by weight based on the total
3 composition weight of a gellable polymer selected from the group consisting of
4 hydroxypropylmethylcellulose, hydroxypropylcellulose having a viscosity
5 comprised between 4000 and 100,000 cPs.

1 17. The controlled release pharmaceutical composition wherein said gellable
2 polymer is contained in amounts comprised between 1 and 4% by weight based
3 on the total composition weight.

1 18. The controlled release pharmaceutical composition according to any one of
2 claims 13-17 in the form of tablets , pellets and granules.

- 1 19. The controlled release pharmaceutical composition according to claim 18 in
2 the form of tablets having the ratio surface/volume R comprised between 0.7 and
3 0.9.
- 1 20. A process for preparing the controlled release pharmaceutical compositions in
2 the form of tablets according to anyone of claims 18 or 19 comprising directly
3 compressing the complex according to any one of claims 1-10.
- 1 21. The controlled release pharmaceutical compositions according to claim 18 in
2 the form of pellets having an average particle size ranging from 1 to 3 mm.
- 1 22. The controlled release pharmaceutical compositions according to claim 18 in
2 the form of granules having an average particle size ranging from 0.2 to 1 mm.
- 1 23. A process for preparing the controlled release pharmaceutical compositions in
2 the form of granules according to anyone of claims 18 and 22 or in the form of
3 pellets according to any one of claims 18 and 21 comprising the following steps:
4 (i) kneading the carrageenan complex powder according to the present invention
5 with an alcoholic solvent in the presence of a binder such as ethyl or
6 methylcellulose having a viscosity ranging from 10 to 100 cPs,
7 (ii) granulating the kneaded mixture in a suitable granulator,
8 (iii) drying the wet granules or pellets,
9 (iv) classification of the granules or the pellets to separate the granules or pellets
10 having the desired average particle size.
- 1 24. A process for the preparation of the tablets according to any one of claims 18
2 and 19 comprising
3 i') preparing the granules with the process according to claim 23,
4 ii') compressing the granules coming from step (i')
- 1 25. A controlled release pharmaceutical composition in the form of a tablet
2 containing a:
3 A) a core
4 B) an external layer completely or partially covering the core tablet containing the
5 carrageenan complex with the basic water soluble drug according to any one of
6 claims 1-10, said external layer being applied by compression.
- 1 26. The controlled release pharmaceutical composition according to claim 25

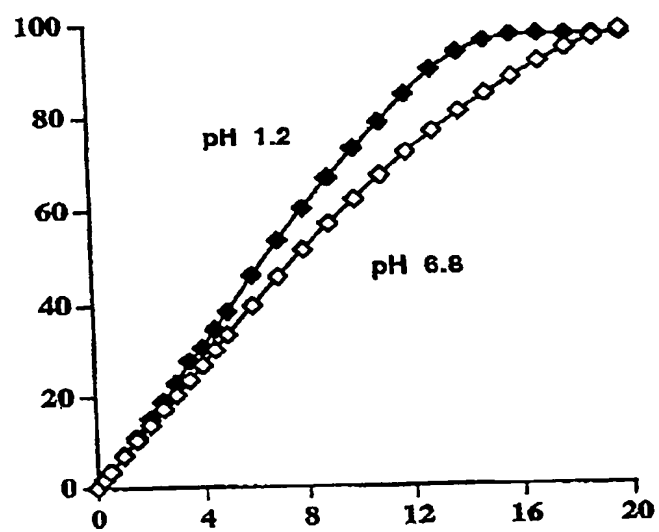
2 wherein the external layer contains the complex according to any one of claims 1-
3 10 in amounts ranging from 60 to 100%.

1 27. The controlled release pharmaceutical composition according to anyone of
2 claims 25 and 26 containing the complex according to anyone of claims 1-10, in
3 amounts ranging from 80 to 100%.

1 28. The controlled release pharmaceutical composition according to anyone of
2 claims 25-27 optionally containing up to 5%, by weight based on the total
3 composition weight of a gellable polymer selected from the group consisting of
4 hydroxypropylmethylcellulose, hydroxypropylcellulose having a viscosity
5 comprised between 4000 and 100,000 cPs., in order to further modulate the drug
6 release.

1 29. The controlled release pharmaceutical composition according to claim 28,
2 wherein the gellable polymer content is comprised between 1 and 4% by weight
3 based on the total external layer weight.

Figure 1



2/5

Figure 2 A

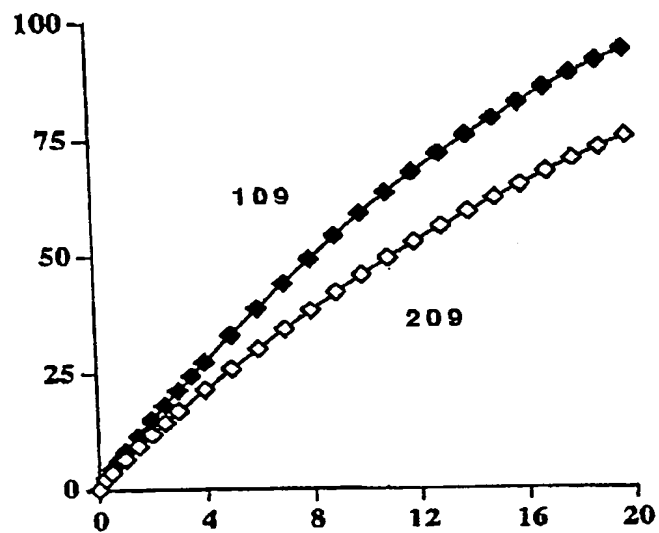
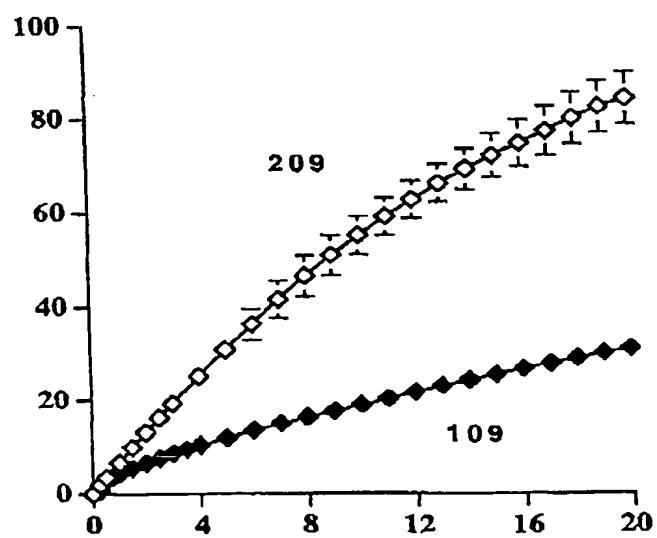


Figure 2 B



3/5

Figure 3 C

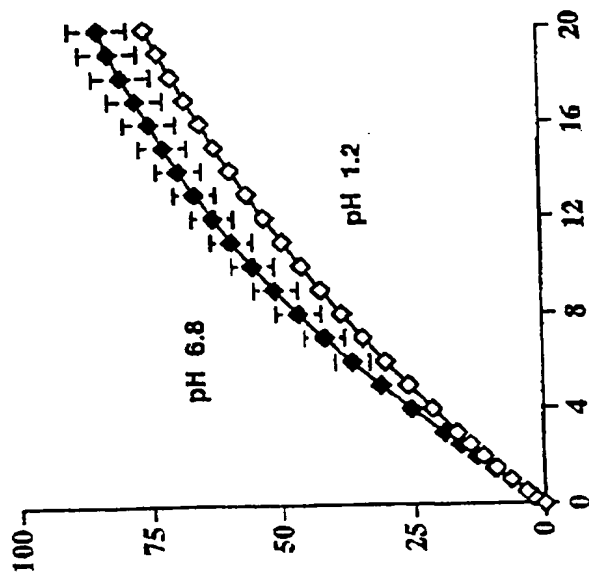


Figure 3B

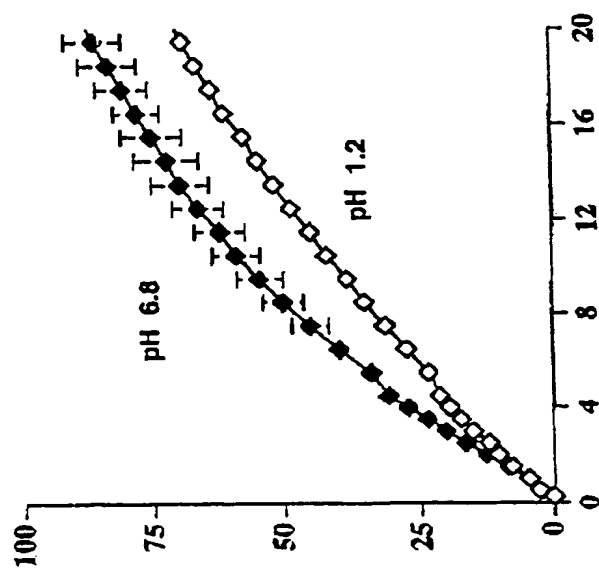
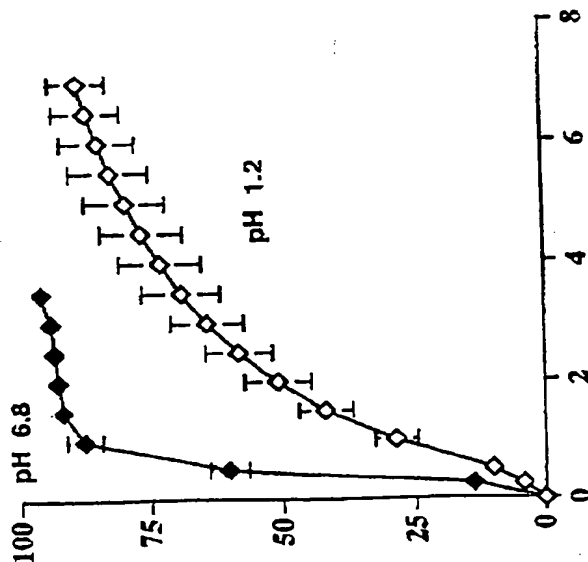


Figure 3 A



4/5

Figure 4 A

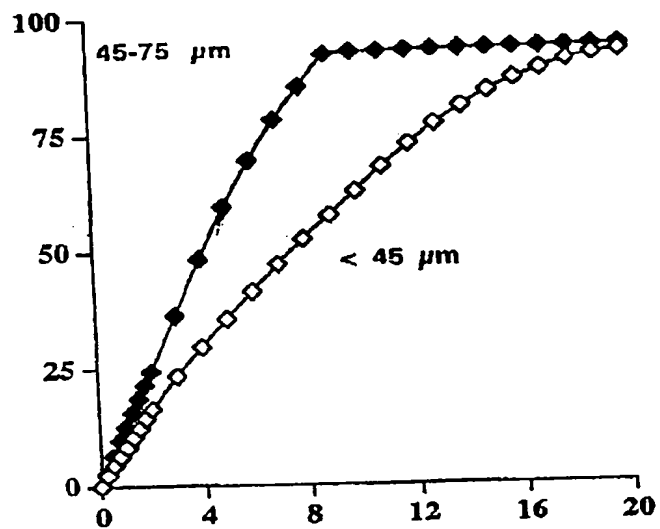


Figure 4 B

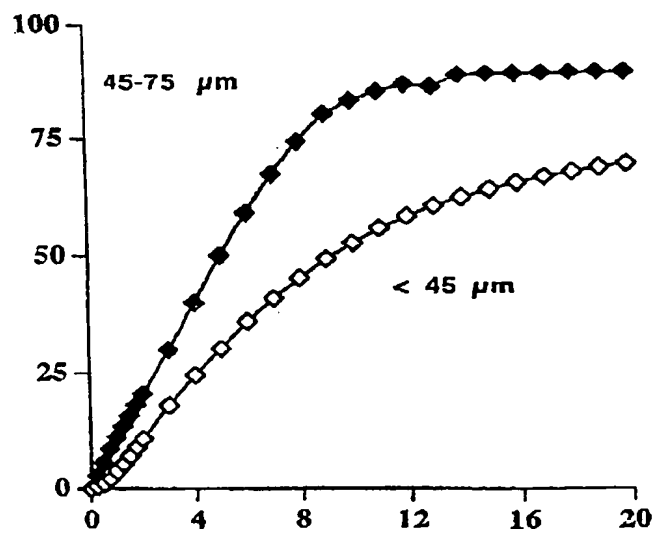
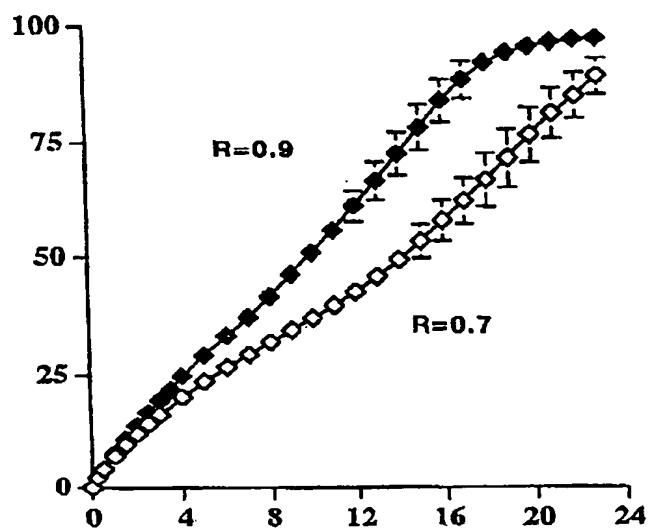


Figure 5



PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 9/20	A1	(11) International Publication Number: WO 95/01781 (43) International Publication Date: 19 January 1995 (19.01.95)
<p>(21) International Application Number: PCT/EP94/01050</p> <p>(22) International Filing Date: 2 April 1994 (02.04.94)</p> <p>(30) Priority Data: MI93A001486 9 July 1993 (09.07.93) IT</p> <p>(71) Applicant (for all designated States except US): APR APPLIED PHARMA RESEARCH SA [CH/CH]; Via Giulia 43, CH-6855 Stabio (CH).</p> <p>(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): CONTE, Ubaldo [IT/IT]; Viale Taramelli, 12, I-27100 Pavia (IT). MAGGI, Laretta [IT/IT]; Via Folperti, 3, I-27100 Pavia (IT). GIUNCHEDI, Paolo [IT/IT]; Via Riviera, 85, I-27100 Pavia (IT).</p> <p>(74) Agents: DRAGOTTI, Gianfranco et al.; Saic Brevetti s.r.l., Viale Bianca Maria, 15, I-20122 Milano (IT).</p>		<p>(81) Designated States: CA, KR, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Published <i>With international search report.</i></p>
<p>(54) Title: MULTILAYERED CONTROLLED-RELEASE ORAL SOLID PHARMACEUTICAL FORMS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Disclosed is a novel pharmaceutical form, consisting of a tablet capable of releasing the active material under controlled and differentiated rates; the novel pharmaceutical form is designed so as to obtain optimum plasmatic levels of the drug for a predeterminable period of time and thus making it possible to simplify the posological scheme, achieving at the same time a higher and certain therapeutic utilisation. Fundamentally, it is a two or more layered tablet, of which one at least intended to release a drug portion in short times, a second layer and optionally a third layer being suitable for gradually releasing portions of active principle.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	GB	United Kingdom	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Niger
BE	Belgium	GR	Greece	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	HU	Hungary	NO	Norway
BG	Bulgaria	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IT	Italy	PL	Poland
BR	Brazil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Romania
CA	Canada	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxembourg	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LV	Latvia	TG	Togo
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DE	Germany	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	US	United States of America
FI	Finland	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

- 1 -

MULTILAYERED CONTROLLED-RELEASE ORAL SOLID PHARMACEUTICAL FORMS

The present invention relates to novel pharmaceutical forms for oral administration capable of releasing active substances at controlled and differentiated rate.

It is well known that the pharmaceutical forms for the oral administration are the overwhelming majority of the pharmaceutical market for numerous and diversified reasons which, in the case of tablets, are mainly determined in that they guarantee precise dosage, excellent stability of carried active materials and easy administration.

In the last twenty years, of great importance has been the achievement of more and more sophisticated and diversified pharmaceutical forms, with the purpose of simplifying the posological scheme and a consequent greater patient's compliance.

Such so called modified or controlled release pharmaceutical forms were aimed at, in the majority of cases, releasing the active material carried therein at constant rate in time, following a release kinetics defined as being of zero order.

In some cases it was also possible to highlight that, to a drug release at a constant "in vitro" rate, corresponded a more regular trend of plasmatic levels obtainable consequently to the administration to the patient.

If, in theory, such approach could have been correct so far some drugs are concerned, in the practice it has been noticed that, in many cases, the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the active material in biological liquids are influenced and sometimes strictly determined by chronobiological rhythms. Furthermore, the developments of systems able to release the active material at constant rate has brought to the designing and therapeutical utilization of dosage forms more and more sophisticated that required the use of always new polymeric substances with specific properties from the technological and productive point of view. However, such polymeric materials, which are normally biocompatible, not always appears biodegradable as well, and this implies that residues of these polymeric materials employed in creating said therapeutic systems could remain in the organism and, above all, by repeated administration, cause unwanted accumulation phenomena.

In this respect, the setting in of now and then serious and, in some cases, lethal side effects occurred following the administration of the so called OROS systeme osmotic pump disclosed in the US Patent No. 4.160.020, 1979, may be mentioned.

In the majority of cases, the slowing down of the active material release is obtained by utilizing gellable hydrophilic polymers capable of swelling in contact with water



- 2 -

and/or aqueous fluids, thereby forming a gelled layer. From these systems the active material is in general released according to a Fickian type kinetics.

A number of studies and research work has been carried out in the past and also recently aiming at the modulation of the release rate of the principles. These researches were originated both by needs of therapeutical nature (for instance the achievement of determined hematic and bioavailability levels of the drug) and by practical problems related to the timing of the drug administration.

Generally these studies lead to proposals consisting in two layer tablets, prevalingly of concentric type, one of which was capable of a fast release of the active principle whereas the other was formulated so as to provide a slow or delayed releasing of the drug.

In some cases (WO-A-9305769 and EP-A-0384514) the outer layer is that with slow release, whereas the inner one (thus accessible only when the outer layer has fulfilled its function) is of the fast release type.

In other cases (US-A-2993836 and US-A-2887438) the delayed release layer forms on the contrary the core of the tablet, whereas the outer coating layer is formulated for a fast or instantaneous release of a portion of the active principle.

Accordingly to further proposals two layer tablets have been disclosed in which the composition of the slow release layer was taken into consideration.

For instance in US-A-2951792 the slow release layer consists of lipidic matrix formed by fatty alcohols or acids or more generally fatty derivatives. Besides the features relating to the formulation, particular attention is paid to the tablet size and to the extension of the area from which the release takes place.

In the two layer tablet disclosed in GB-A-2123291, the fast release part has a conventional composition, whereas that with slow release must contain at least one surface active ingredient.

Moreover the release delaying agent consists of a mixture of cellulose derivatives and of a slow solubilizing agent for the polymer mixture (particularly PEG).

EP-A-63266 disclosed a two layer composition (a fast release and a slow release layer) wherein exclusively sodium alginate is used as the release delaying agent.

However the prior proposals were not satisfactory for several reasons, whereby it is still of interest the problem of the therapeutical cases wherein the administration (as acute or symptomatic treatment) of a first therapeutically effective dose of an active material is required, whereas in a following step the slow or at a lower rate administration of a maintenance dose of the same or different drug is necessary.

- 3 -

These therapeutic needs obviously required complicated posological schemes that not always are correctly complied with by the patient, especially if referred to outpatient's treated subjects; it is well known in fact that the giving up of a correct compliance of the posological schemes is directly proportional to the complexity and number of the daily required or recommended administrations.

In the case, for example, of rheumatic diseases, particularly for the night time pain treatment, it would be better to have the availability of pharmaceutical forms capable of a fast release of a dose of the drug for the so called acute treatment, whilst a second quantity should be slowly released, in order to maintain for a more prolonged period of time a plasmatic level sufficiently high and therapeutically effective.

That is, during this second step the release of the active substance should occur at a rate comparable to that of the drug elimination (due to either the metabolism or normal biological elimination processes).

The main object of the present invention is to solve the above explained problems and drawbacks, keeping unchanged the oral administration form by means of tablets.

A more specific object of the present invention is a novel pharmaceutical form containing one or more active substances that can be released with different release kinetics and, namely, that such pharmaceutical form be designed and realized to meet the specific therapeutic requirements of particular pathological situations as those quoted in the introduction. The new form is in fact intended mainly of the administration of one or more drugs, one of which must act immediately, while a hematic level or a therapeutic activity for a more prolonged period of time is required for the second active substance (or for a portion of the same active substance).

These objects are achieved with the pharmaceutical form of the invention, which consists of a solid form having at least two layers of which:

- at least a first layer contains an active material, carried with usual excipients and additives, that is able to promote the compressibility of the mass, in which the active material is distributed, such as to guarantee an immediate release of the active material, and
- at least a second layer, superimposed upon the first one, carries a portion of the same active material of said first layer or a second active material, the formulation of said second layer involving the use of excipients and adjuvants which can adjust the releasing rate of the active material at a definitely differentiated rate in comparison with that of the above mentioned first layer.

- 4 -

The novel formulation in accordance with the present invention allows, as a matter of fact, the use of well-established production technologies and to obtain the possibility of administering one or more active materials that are released by the pharmaceutical formulation with differentiated releasing rates.

The designed and realised system, as better pointed out by the examples supporting the present application, is intended for the administration of:

- 1- One drug only, released at different rates: one quantity immediately and a quantity within a prolonged and /or anyhow programmable period of time.
- 2- Two drugs, one of which is immediately released and the second one within a more prolonged period of time.
- 3- Association of two drugs, of which one quantity (drug 1 + drug 2) is immediately released and one quantity (of both) in a prolonged period of time.
- 4- Three drugs, one of which is released fast, a second one is released at a "in vitro" programmable speed in a longer period of time, and a the third one, that is released in an even more prolonged period of time.

The figures 1 and 2 of the enclosed drawings show two embodiments of the invention respectively with two layers (a and b, fig. 1) and three layers (a, band C, fig. 2).

In preparing the different layers, besides the active material and depending on its solubility characteristics in water and/or aqueous liquids, polymeric materials capable of adjusting (slow down and/or accelerate) the active material release are also employed.

Among these substances of particular importance as regards the release rate are the so-called disintegrating and superdisintegrating polymers. Exhaustive information about these polymers are contained in the paper by Shangrow R, et al. Pharmaceutical Technology, October 1980, which is hereing recalled for reference.

With regard to active materials sparingly soluble in water, particular adjuvants to facilitate a rapid solubilization can be used, such as cyclodextrins, superdisintegrators, etc., as reported in the book "Techniques of solubilization of drugs" by S.H. Yalkowsky Ed. M. Dekker, New York 1985, and in the Italian patent application No. 21091 A/90 of July 20, 1990.

Active materials for the prevention of anginous attacks and hypertensive attacks, such as:

trapidil, diltiazem, verapamil, urapidil, or anti-inflammatory non steroidal (NSAID) or steroidal drugs: trapidil (7-diethylamino-5-methyl-1,2,4-triazol[1,5-a]pyrimidine),

- 5 -

diltiazem hydrochloride
 (cis-(+)-3-acetoxy-5-(2-dimethylaminoethyl)-2,3-dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one hydrochloride), verapamil hydrochloride
 (5-[N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-N-methylamino]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitrile hydrochloride), Urapidil hydrochloride
 (6-[3-(4-o-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]propylamino]-1,3-dimethylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione hydrochloride) or non steroidal antiinflammatory drugs (NSSAID) or steroidal diclofenac sodium (sodium 2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetate), indomethacin ([1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]acetic acid), ibuprofen lysine salt (2-(4-isobutylphenyl)propionic acid compounded with L-2,6-diaminohexanoic acid acetate), ketoprofen (2-(3-benzoylphenyl)propionic acid), diflusal (-(2,4-difluorophenyl)salicylic acid), piroxicam
 (4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide), naproxen (+)-2-(6-methoxy-2-naphtyl)propionic acid, flurbiprofen (2-(2-fluorobiphenyl-4-yl)propionic acid) or sleeping substances and tranquillizers, such as diazepam
 (7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one), nitrazepam (1,3-dihydro-7-nistro-5-phenyl-1,4-benzodiazepin-2-one) or antihistaminic and/ r antiasthmatic drugs, such as ephedrine ((1R,2S)-2-methylamino-1-phenylpropan-1-ol hemihydrate), terfenadine (1-(4-tert-butylphenyl)-4-[4-(α -hydroxybenzhydryl)piperidino]butan-1-ol), teophhylline
 (3,7-dihydro-1,3-dimethylpurine-2,6(1H)-dione), chlorpheniramine
 ((\pm)-3-(4-chloro-phenyl)-NN-dimethyl-3-(2-pyridyl)propylamine hydrogen maleate) can be carried in the described pharmaceutical form.

As polymeric substances for the preparation of said for fast realising layer of the active material, cross-linked polyvinylpyrrolidone, microcrystalline cellulose and cellulose derivatives, cross-linked sodium carboxymethylcellulose, carboxymethylstarch, potassium methacrylate-divinylbenzene copolymer, polyvinylalcohols, starches, starch derivatives, beta cyclodextrin and dextrin derivatives in general may be for example employed. Said polymeric substances make up from 10% to 90% of the layer's weight.

In said first layer other adjuvant substances may further find utilization, consisting of the so called effervescent mixtures, namely that can rapidly disintegrate the tablet or, in the specific case, the layer when it comes in contact with aqueous liquids and, preferably, with gastric juice.

- 6 -

These substances include the carbonates and bicarbonates of sodium and of other alkali metals or earth-alkali metals, the glycine sodium carbonate and other pharmaceutically acceptable salts, capable of producing effervescence in an acid environment.

Depending on the pH of the medium where the rapid disgregation of the compacted product should occur, further substances such as citric, tartaric, fumaric acids that can produce the effervescence and the rapid disgregation of the compacted product may find use in the formulation.

In the preparation of the slow release second layer, adjuvants may be used such as natural and/or synthetic polymeric materials belonging to the class of the so called hydrophilic gellable polymers, capable of slowing down the active material release from said layer.

The polymeric materials for the preparation of the slow release second layer may be selected in the class that includes hydroxypropylmethylcellulose of a molecular weight of between 1,000 and 4,000,000, hydroxypropylcellulose of a molecular weight of between from 2,000 to 2,000,000, carboxyvinylpolymers, polyvinyl alcohols, glucans, scleroglucans, mannans, xanthans, carboxymethylcellulose and its derivatives, methylcellulose and, in general, cellulose derivatives.

Of all the mentioned polymers various types are commercially available, characterized by different chemical, physical, solubility and gelling properties, in particular concerning hydroxypropylmethylcellulose, various types of different molecular weight (1,000 to 4,000,000) and different substitution degree can be employed.

Said hydroxypropylmethylcellulose types exhibit different characteristics, being prevalingly erodible or prevalingly gellable as a function of the viscosity in the polymeric chain. According to the solubility of the active material and of the hydration and/or erosion properties of the polymeric substance, different release and "in vitro" programmable rates could be achieved by suitable tests.

Said polymeric substances might be present in a percentage of 5 to 90% based on the total weight of said second layer but, preferably, from 50 to 85%.

Finally, excipients usually employed in the pharmaceutical technics can find application, such as mannitol, lactose, magnesium stearate, colloidal silica and others like glyceril monostearate, hydrogenated castor oil, waxes, mono-, bi- and tri-substituted glycerides.

Onto said finished tablets, a film of polymeric gastroresistant and enterosoluble material may be further applied, in order to allow the activation of the system only

after the tablet has reached the duodenal-intestinal tract.

Pharmaceutical systems of this latter type might find use to make tablets specifically designed and intended to release the active material in the last part of the intestinal tract, namely at the colon level.

Cellulose acetophthalate, cellulose acetopropionate, cellulose trimellitate, acrylic and metacrylic polymers and copolymers, having different molecular weight and solubility depending on different pH values, may be used as polymeric materials for realizing gastroresistant systems.

Said gastroresistant and enterosoluble materials can be also utilized associated with retardan polymers.

Said gastroresistant and enterosoluble materials can be also utilized in combination with retardant polymers.

The pharmaceutical form relations of the present invention allow therapeutic results and quite unpredictable advantages to be reached as it will be confirmed by experimental tests carried out both "in vitro" and "in vivo".

Referring for sake of description simplicity to the case wherein only one active material is administered either in the immediate release form or in that of programmed release, the pharmaceutical form of the present invention is likely to achieve the following results:

1) The immediate release of an amount of active material such as to set a plasmatic concentration equal to the minimum threshold needed for a symptomatic or active treatment; if it is borne in mind that, in the pharmaceutical forms for oral use with immediate release, a peak or maximum is reached in a time relatively closed to the administration arriving at a plasmatic concentration greater than the minimum required for a symptomatic therapeutic effect, this also means that with the new pharmaceutical form of the present invention the administered dosage is lower as compared to that usually estimated for the acute treatment.

Considering also that many of the drugs involved in the present invention, as for example the antinflammatory active principles, often exhibit high toxicity and are gastrodetrimental the important advantage thus achieved is clearly evident.

The slow or retarded release of the same active material starts when a plasmatic concentration, higher than that which can be achieved with the only slow release form is already secured, whereby plasmotion level higher than those which can be achieved with the only slow release form are recured the time being the same from the beginning of the treatment.

- 8 -

Another aspect adds to such therapeutically important results, namely that the pharmaceutical form of the present invention is prepared by means of production technologies consolidated in the practice and presently used, whereby are directly applicable on industrial scale.

The following examples describe, by way of illustration and by no limitation whatsoever, the preparation of the pharmaceutical forms according to the invention.

Example 1: Two-layered tablet, containing 200 mg trapidil, one layer of which contains 50 mg for a fast release and the second slow release layer with additional 150 mg trapidil.

1-a Preparation of the granulate forming the first fast release layer, comprising as active material 50 mg trapidil.

Trapidil (B.15910100)	50.0 mg
Lactose (C.Erba, Milan, I)	25.0 mg
Starch maize (C.Erba, Milan, I)	15.0 mg
Polyvinylpyrrolidone (Plasdone K29-32, Gaf Corp., Wayne, NY USA)	1.0 mg
Carboxymethylstarch (Explotab, Edward Mendell Co. Inc. Carmel, NY USA)	10.0 mg
Magnesium stearate (C.Erba, Milan, I)	2.0 mg
Talc (C.Erba, Milan, I)	3.0 mg

Total	106.0 mg
-------	----------

Trapidil, lactose and maize starch are mixed and wetted with a 10% polyvinylpyrrolidone solution in ethanol, followed by sieving on a 25 mesh sieve, drying so produced the granulate in an oven up to constant weight and sieving again on the same sieve. Carboxymethyl starch, magnesium stearate and talc are added, mixing thereafter in Turbula for 15 minutes.

A granulate (granulate A) is in this way made, showing good flow and compacting

- 9 -

properties. The granulate undergoes the compression step as hereinafter described.

1-b Preparation of the granulate used to prepare the second layer containing 150 mg slow release trapidil

Trapidil (B.15910100)	150.0 mg
Mannitol (C.Erba, Milan, I)	85.0 mg
Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel K 4 M, Colocorn Orpington UK)	45.0 mg
Polyvinylpyrrolidone (Plasdone K29-32, Gaf Corp., Wayne, NY, USA)	7.5 mg
Magnesium stearate (C.Erba, Milan, I)	1.5 mg
Colloidal silica (Syloid 244, Grace GmbH, Worms D)	1.5 mg

Total	290.5 mg
-------	----------

Trapidil, mannitol and hydroxypropylmethylcellulose are mixed and wetted with a 10% ethanol solution of pyrrolidone.

After sieving on a 25 mesh sieve, so produced the granulate is dried in an oven at 40°C up to constant weight and sieved again on the same sieve. The magnesium stearate and colloidal silice are added and mixed in Turbula for 10 minutes.

With this procedure a granulate (granulate B) is obtained with good flow and compacting properties. The granulate undergoes the compression step as hereinafter described.

1-c Preparation of finished systems (by compression)

A Layer Press rotative compression machine (Manesty Liverpool U.K.) is used to prepare tablets as shown in Fig. 1b; this machine as known by those stilled in the art, consist of a rotative compression mechanism equipped with two or three loading stations and thus able to make two or three layered tablets. In the specific case, the

- 10 -

machine is assembled and set to produce two layered tablets.

The machine for this purpose is equipped with oblong (capsule-type) punches of 16x16 mm. The first loading hopper is filled with the granulate described at point 1-a (granulate A), while the second one is filled with the granulate described at point 1-b (granulate B). The first loading station is adjusted so as to provide layers of 106 mg granulate (equal to 50 mg active material) while the second loading station is adjusted so as to provide an amount of granulate B (slow release active material) of 290,5 mg equal to 150 mg active material.

By operating as previously illustrated, two-layered tablets, are produced weighing on average 396,5 mg which totally contain 200 mg trapidil. Said finished systems are subjected to the dissolution test as hereunder specified.

1-d Dissolution test

To evaluate the releasing features of the finished (two-layered) systems, the basket apparatus 1 (described in USP XXII) is utilized, operating at 100 r.p.m. and using as a dissolution fluid 1000 ml of deionized water at 37°C. The active material release is monitored by U.V. spectrophotometric determination at 299 nm, with an automatic system of sampling and quantitative determination, and with an automatic data processing program (Spectrocomp 602, Advanced Products-Milano). The test results are listed in Table 1

TABLE 1

Time (min)	% released trapidil
15	27,0
30	37,5
60	45,3
120	57,7
240	75,5
360	100,6

It clearly appears that 25% of the 200 mg of the carried active material (first amount) is fast released in 15 minutes, whereas the second amount is released in about 6 hrs.

The data reported in Table 1 have been transferred in the figure 3 graph: to help in a comparison, figures 4 and 5 report the graphs obtainable with the same dissolution test procedure, referred respectively only to the fast release form of 50 mg active material (that is of the trapidil itself) and only to the slow release form of 150 mg active material.

figure 5 shows the same release curves in just one graph, and it is easy to appreciate that, with the pharmaceutical form of the present invention, (curve a) an initial peak clearly higher than that attainable with the only form of retarded release is achieved, making it sufficient to add in the immediate release pharmaceutical form an active material concentration sufficient just to exceed the minimum threshold at which an immediate effect or, in other words of symptomatic treatment is attained to achieve the desired result.

In other words, from figure 5 it can be immediately appreciated that in the immediate release form (curve b) the 100% level of the active material release is quickly reached (within 15 minutes) and this makes to estimate that such a drug's quantity might be similarly absorbed attaining effective plasmatic concentrations. Likewise, in the case of administering the only one form of slow or retarded release (curve C), the total release occurs after a very long time, and therefore, a release level "in vivo" sufficient to produce a therapeutic effect will also be reached after a longer time.

Thus before the present invention, the therapeutical choice had to be made between adopting a symptomatic or shock therapy and a treating and maintaining therapy without, or at least with a poor symptomatic effect.

With the pharmaceutical form of the present invention comprising the two dosages of the immediate release and slow release forms respectively, as it is easy to verify from the corresponding curve (c) of Figure 5, the release is about twice as much as that of the only slow release form, and is high enough to produce an immediate symptomatic effect.

Once this initial function is completed, the release takes place in the same way as with the slow release form, which consequently affect the release of the immediate release form.

An experimental confirmation of the previous "in vitro" tests has been obtained by carrying out the "in vivo" treatment in well being volunteers at the following dosages (and by plotting in figure 6 the corresponding plasmatic levels as a function of time):

- (i) Fast release pharmaceutical form containing 100 mg of trapidil (curve b of figure 6) and
- (ii) Slow release pharmaceutical form containing 200 mg of trapidil (curve c of figure 6) and
- (iii) Pharmaceutical form according to the presente invention containing 200 mg of

- 12 -

trapidil wherein the 25% of the active material dose was present as a fast release amount, and the remaining 75% was present as a slow release amount (curve a of figure 6).

The numerical data of the aforementioned plasmatic levels are listed in Table 1A which follows.

- 13 -

TABLE IA

Time (hours)	Fast system 100 mg (ng/ml)	Slow system 200 mg (ng/ml)	Fast/Slow system 200 mg (ng/ml)
0.5	1015	482	1767
1	1969	762	2724
2	1464	1638	3205
3	1046	1479	2855
4	575	2058	2813
6	239	466	1815
8	76	421	1301
12	11	14	440
24	8	0	0



- 14 -

From Table and figure 6 it can be immediately appreciated as the pharmaceutical form of the present invention makes it possible to reach the above mentioned therapeutic advantages, namely the effect of the symptomatic treatment (obviously by adjusting in a suitable manner the dosage of the fast release portion and that of ensuring that the slow release form will maintain its effect.

In addition the symptomatic effect is obtained with a lower dosage of active principle (obviously calculated so as to exceed the threshold over which the acute effect is attained), with the clear advantages in terms of lower toxicity or, in the case of anti-inflammatory non-steroidal drugs (FANS), lower gastrolesiveness besides a minor quantity administered to the patient.

Example 2 - Two - layered tablet containing 400 mg of 4-methoxy-N³-(3-pyrimidilmethyl)1,3- benzenedicarboxamide (compound hereinafter indicated with G619), of which one layer contains 200 mg of active material for a fast release and in a second layer there are 200 additional mg of G619 for slow release.

2-a Preparation of the granulate forming the first fast release layer, containing 200 mg of G619 as active material.

G 619 (Farma resa batch n. 89043	200.00 mg
Maize starch	75.00 mg
Mannitol	25.00 mg
Polyvinylpirrolidone (10% in ethanol)	6.25 mg
Carboxymethylstarch (Explotab)	10.00 mg
Magnesium stearate (C.Erba)	3.75 mg
Colloidal Silica (Syloid 244)	0.75 mg

Total	320.75 mg
-------	-----------



- 15 -

2-b Preparation of the granulated used for preparing the second slow release layer wherein 200 mg of G619 are contained.

G 619 (Farma resa batch N. 89043)	200.0 mg
Mannitol (C.Erba, Mila, I)	50.0 mg
Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel K 4 M, Colorcon, Orpington UK)	30.0 mg
Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel E 5, Colorcon, Orpington UK)	30.0 mg
Polyvinylpirrolidone (Plasdone K29-32, Gaf Corp, Wayne NY USA)	13.0 mg
Magnesium Stearate (C.Erba, Milan, I)	2.5 mg
Colloidal Silica (Syloid 244, Grace GmbH, Worms, D)	0.5 mg

Total	326.0 mg
-------	----------

Both these layers are prepared as per Example 1.

2-c Preparation of the finished systems (by compression)

The same rotative compression machine, equipped with oblong (capsule-type) punches of 19 x 9 mm, as described in Example 1, is used to prepare the tablets.

The first loading hopper is filled with the granulate described at point 2-a (granulate A), while the second one is filled with the granulate described in 2-b (granulate B).

The first loading station is adjusted in order to provide layers of 320,75 mg of granulate (equal to 200 mg active material), while the second loading station is

- 16 -

adjusted so as to provide an amount of granulate B (with slow active material release) of 326,0 mg equal to 200 mg active material.

By operating as previously illustrated, two-layered tablets with an average weight of 646,75 mg, totally containing 400 mg of G619, are produced.

Said finished systems are subjected to the dissolution test as hereunder specified.

2-d Dissolution test

To evaluate the releasing features of the finished (two-layered) systems, the 2 paddle apparatus (as per USPXXII) is used, operating at 100 r.p.m. and with 1000 ml at 37°C of deionized water used as a dissolution fluid. The active material release is monitored by U.V. spectrophotometric determination at 251 nm, with an automatic system of sampling and dosage, as well as with an automatic data processing program (Spectracomp 602, Advanced Products Milano).

The results of the tests carried out are listed in Table II.

TABLE II

Time (min)	% Released G619
15	53,0
30	58,5
60	65,0
120	78,2
180	90,3
240	98,5
360	100,4

It is evident that of the 400 mg of the carried active material, 50% (first amount) is fast released, in 15 minutes, whereas the second amount is released in about 4-6 hours.

Example 3 - Two layer tablet containing 800 mg of ibuprofen, one fast release layer containing 250 mg of active principle and the other slow release layer containing 550 mg of ibuprofen.

3-a Preparation of the granulate forming the first fast release layer containing as the active principle 250 mg of ibuprofen.



- 17 -

Ibuprofen (CFM B. 2235/18/87)	250.00 mg
Maize starch (USP grade, C.Erba, Milan, I)	74.63 mg
Dye (Nacarat Red E 120)	0.25 mg
Methylcellulose (BDH, Poole, UK)	1.25 mg
Sodium laurylsulfate (C.Erba, Milan, I)	0.75 mg
Carboxymethylstarch (USP grade)	18.75 mg
Crosslinked polyvinylpyrrolidone (Polyplasdone XL, ISP, Wayne, US)	7.50 mg
Magnesium stearate (C.Erba, Milan, I)	3.37 mg
<hr/>	
Total	356.50 mg

The manufacturing process comprises the preparation of a granulate obtained by admixing, in a sigma mixer (Erweka model type K 5, Frankfurt a.M., D) the proper amounts of active principle and 50 mg of maize starch; the homogeneous powder mixture is wetted with a 1.3% (w/v) aqueous solution of methylcellulose in which the sodium laurylsulfate and the dye have been previously dissolved; the homogeneously moistened mass is forced through a 25 mesh (710 μ m) grid leading to a regular granulate which is dried in an air circulation oven at 40-45°C.

The granulate, after drying to constant weight, is placed into a powder mixer (Turbula mod.T2A, Bachofen, Basel, CH), added with the crosslinked polyvinylpyrrolidone, the remaining 24.63 mg of maize starch and the carboxymethylstarch and admixed for 20 minutes. Then the magnesium stearate is added and the admixing is continued for further 20 minutes. The granulate, lubricated and analyzed for the content of active principle, is subjected to the hereinafter described compression phase.

3-b Preparation of the granulate used for the second slow release layer containing 550 mg of ibuprofen.

- 18 -

Ibuprofen (CFM B. 2235/18/87)	550.0 mg
Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel K4M Colorcon, Orpington UK)	183.3 mg
Mannitol (C.Erba, Milan, I)	110.0 mg
Polyvinylpyrrolidone (Plasdone K 29 ISP, Wayne, NY USA)	18.3 mg
Talc (C.Erba, Milan, I)	16.5 mg
Magnesium stearate (C.Erba, Milan, I)	3.7 mg
Colloidal silica (Syloid 244, Grace GmbH, Worms D)	0.9 mg
<hr/>	
Total	882.7 mg

A granulate is prepared by admixing in a sigma mixer (Erweka model type K5) the proper amounts of ibuprofen, mannitol and hydroxypropylmethylcellulose (Methocel K4M, apparent viscosity 4,000 cP); the homogeneous powder mixture is wetted with a 10% (w/v) alcoholic solution of polyvinylpyrrolidone and the homogeneously wetted mass is forced through a 25 mesh grid leading to a regular granulate which is dried in an air circulation oven at 40-45°C. The granulate, dried to constant weight, is placed in a powder mixer (Turbula model T2A) and added with talc, magnesium stearate and colloidal silica, and admixed for 20 minutes. The granulate is then compressed as hereinafter described.

3-c Preparation of the finished systems (by compression)

For the preparation of the tablets the same rotating compression machine and the same operating conditions as in the previous examples are used, so as to obtain two layer tablets.

The resulting tablets have an average weight of 1239.2 mg containing on the whole 800 mg of ibuprofen, which are subjected to the dissolution test as hereinafter specified.

3-d Dissolution test

- 19 -

In order to assess the releasing behaviour of the tablets the 2 paddle apparatus is used (USP XXII) adjusted for a vessel of 5 litres capacity in order to maintaining the sink conditions, the test being carried out at 100 r.p.m. and using as the dissolution fluid 5 l of simulated intestinal fluid (USP XXII), without enzymes at 37°C. The release of the active principle is monitored by U.V. spectrophotometric measurement at 223 nm, using an automatic sampling and reading system (Spectracomp 602 of Advanced Products, Milano, I).

The results of the test are reported in the following table III

Table III

time (h)	Released % (total)
0.5	31.3
2	37.0
4	42.9
8	52.9
12	66.2
16	78.5
20	88.0
24	99.1

It is thus seen that from the tablets the fast release of the first amount of drug (about 31% of the total) is obtained within 30 minutes, whereas in the second phase, definitely differentiated from the first one, the drug is released under controlled rate in about 24 hours.

The foregoing examples refer to pharmaceutical forms containing only one active material divided within two layers.

It is understood that is also possible and foreseen within the scope of the present invention to produce, with the above mentioned procedures, three-layered pharmaceutical forms, that is with delayed release of the same active material but adjusted at different rates from one layer to another.

Similarly, the third layer might instead include another active material for supplementing, at a certain point of the treatment, the therapeutic effect of the first active material, already released in fast and/or slow released form as well.

- 20 -

So far the realisation of the aforementioned pharmaceutical forms is concerned, these are made with the galenical technics already cited, and by employing the adjuvants and carriers well known by themselves in the technical field.

It should be finally noted that the previous list of the active materials which can be used in the pharmaceutical forms of the present invention is not intended as a limit since, as it is evident, the invention is extended to all the active materials, for which is foreseen or foreseeable either the fast release administration for a systemic therapeutic effect or the slow release administration for a treatment of maintaining or prolonging the main therapeutical effect.

- 21 -

CLAIMS

1. Pharmaceutical form for oral administration and in a solid form capable of releasing the active material or the active materials carried therein in subsequent times, characterized in that:

- at least a first layer contains an active material, carried with excipients and additives, selected from the group of the disintegrating and/or superdisintegrating croos-linked, such as cross-linked polyvinylpyrrolidone, sodium carboxy methylcellulose carboxymethyl starch, potassium methacrylate - divinylbenzene copolymer, polyvinylalcohols, starches, starch derivatives, microcrystalline cellulose an cellulosic derivatives, beta cyclodextrin, dextrans derivatives, and their mixtures such as to guarantee a fast release of the active material and

- at least a second layer, placed upon the first, containing a portion of the same active material of said first layer or of a second active material, the formulation of said second layer involving the use of excipients and adjuvants which can adjust the releasing rate of the active material at a definitely differentiated value in comparison with that of the aforementioned first layer, selected from the group comprising hydroxypropylmethylcellulose of molecular weight from 1.000 to 4.000.000, hydroxypropylcellulose of molecular weight from 2.000 to 2.000.000, carboxyvinylpolymers, polyvinylalcohls, glucans, scleroglucans, mannans,xanthans, alginic acid and poly(methylcellulose and it derivatives, methylcellulose.

2. Pharmaceutical form according to claims 1, characterized in that said disintetrating or superdisintetrating compounds of said first layer make up from 10 to 90% by weight of the same layer preferably from 20 to 70% by weight.

3. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said additives contained in said first layer are adjuvants selected form the groups including starch, pregelled starch, calcium phosphate, mannitol, lactose, sucrose, glucose, sorbitol, microcrystalline cellulose and binding agents such as gelatin, polyvinylpyrrolidone, methyl cellulose, starch water (o paste) ethylcellulose, gum arabic, tragacanth gum, and lubricants and antiadhering compounds such as magnesium stearate, stearic acid, colloidal silica, glyceril mnostearate, polyoxyethyleneglycols of 400 to 50000 molecular waight, hydrogenated castoroil, waxes and mono, bi and tri-substituted glycerides.

4. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said additives in said first layer are made of effervescent mixture that is capable to cause a rapid disintegration said first layer when it camos in contact with an aqueous enviroument and preferably with gastric juice.

- 22 -

5. Pharmaceutical form according to Claim 4, characterized in that said additives are selected from the group of sodium carbonates and/or of other alkaline metals and/or alkaline-earth metals, sodium bicarbonate and other bicarbonates, glycine sodium carbonate, and other pharmaceutically acceptable salts, that can produce effervescence in acid environment, as well citric acid, tartaric acid, fumaric acid, capable of producing the effervescence and the rapid disintegration of said first layer, independently from the pH.

6. Pharmaceutical form according to Claim 5, characterized in that said materials capable of producing effervescence make up 3 to 40% by weight of said first layer.

7. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that it comprises a second and a third layer including a same or different active material together with polymeric materials, excipients and adjuvants.

8. Pharmaceutical form according to Claim 7, characterized in that said polymeric materials of said second and possible third layer make up to 5 to 90% by weight of the same layer.

9. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said adjuvants contained in said at least one slow release layer are selected from the group including polyvinylpyrrolidone, methylcellulose, starch water (o paste) ethylcellulose, arabic gum and tragacanth gum, and other materials with binding properties in wet and/or dry conditions.

10. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said adjuvants of said at least one slow release layer are selected from the group comprising glyceril monostearate, semi-synthetic glycerides, glycerilpalmitostearate, glyceril behenate, microcrystalline cellulose, sodium carboxymethylcellulose, magnesium stearate, stearic acid, sodium stearate, talc, sodium benzoate, boric acid and colloidal silica.

11. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said adjuvants of said at least one slow release layer are selected from the group comprising hydrogenated castor oil, fatty acids, waxes and mono-bi-and tri-substituted glucerides, polyoxyethyleneglycols and their derivatives with molecular weight of from 400 to 60.000.

12. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said active materials are selected from the group including steroidal or non-steroidal anti-inflammatories (NSAID1), sleeping substances and tranquillizers, active substances for preventing anginous and hypertensive attacks, and antihistaminic acid/or antiasthmatic drugs and combinations thereof.

- 23 -

13. Pharmaceutical form according to Claim 12, characterized in that said anti-inflammatory is selected from diclofenac sodium, indomethacin, ibuprofen, ibuprofen lysine salt, ketoprofen, diflunisal, piroxicam, naproxen, flurbiprofen.

14. Pharmaceutical form according to Claim 12, characterized in that said sleeping substance or tranquillizer is selected among diazepam, nitrazepam, flurozepam, oxazepam, chlorodiazepoxide.

15. Pharmaceutical form according to Claim 12 characterized in that said antianginous and antihypertensive active material is selected among diltiazem, trapidil, verapamil, urapidil, benziodarone dipyridamole.

16. Pharmaceutical form according to claim 12, characterized in that said antihistaminic or antiasthmatic material is selected among ephedrine, terfenadine, theophylline, chloropheniramine, terbutiline.

17. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said first layer has a thickness from 0,5 to 5 mm and contains from 1 to 90% by weight of active material.

18. Pharmaceutical form according to Claim 1, characterized in that said second layer and possible third layer has a thickness of from 0,1 to 6,0 mm and contains from 10 to 90% by weight of gellable, and/or soluble and/or erodible polymer and from 1 to 90% by weight of active material.

19. Pharmaceutical form according to claim 1 or 8, characterized in that said second and third layer contain a portion of the same active material carried in the first layer.

20. Pharmaceutical form according to Claim 1 or 8, characterized in that an active material, different from that included in the first layer, is carried in the second and third layer.

21. Pharmaceutical form according to Claims 1 or 8, characterized in that said third layer contains, in addition to the active material or active materials, also other adjuvants selected among those mentioned in Claims 1 to 6.

- 1/5 -

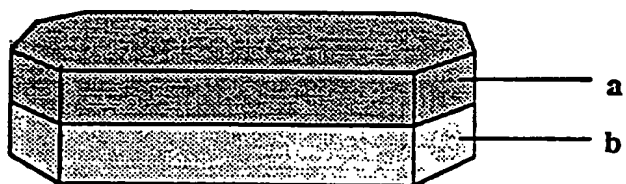


Fig. 1

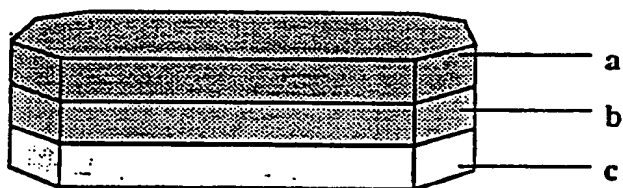
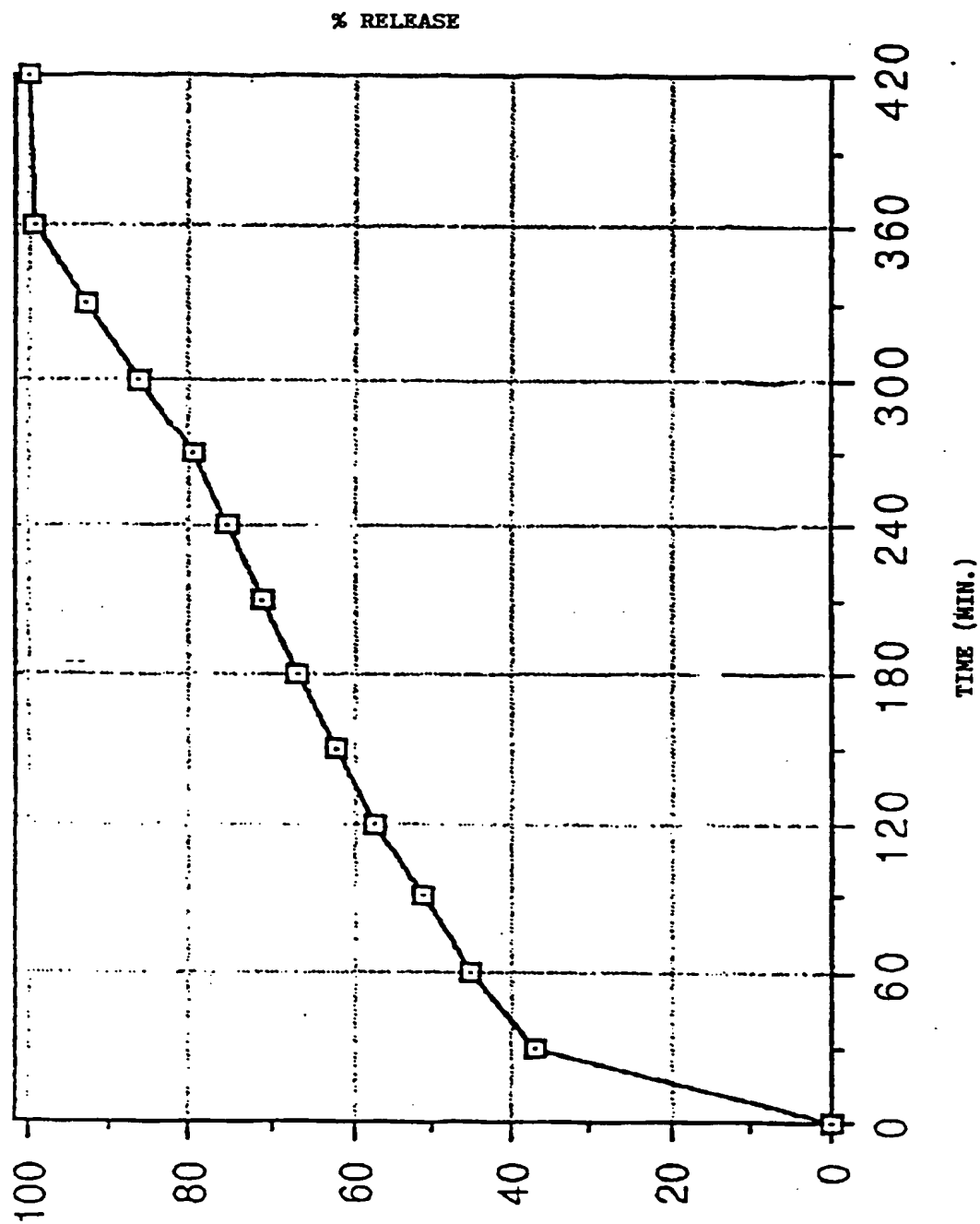


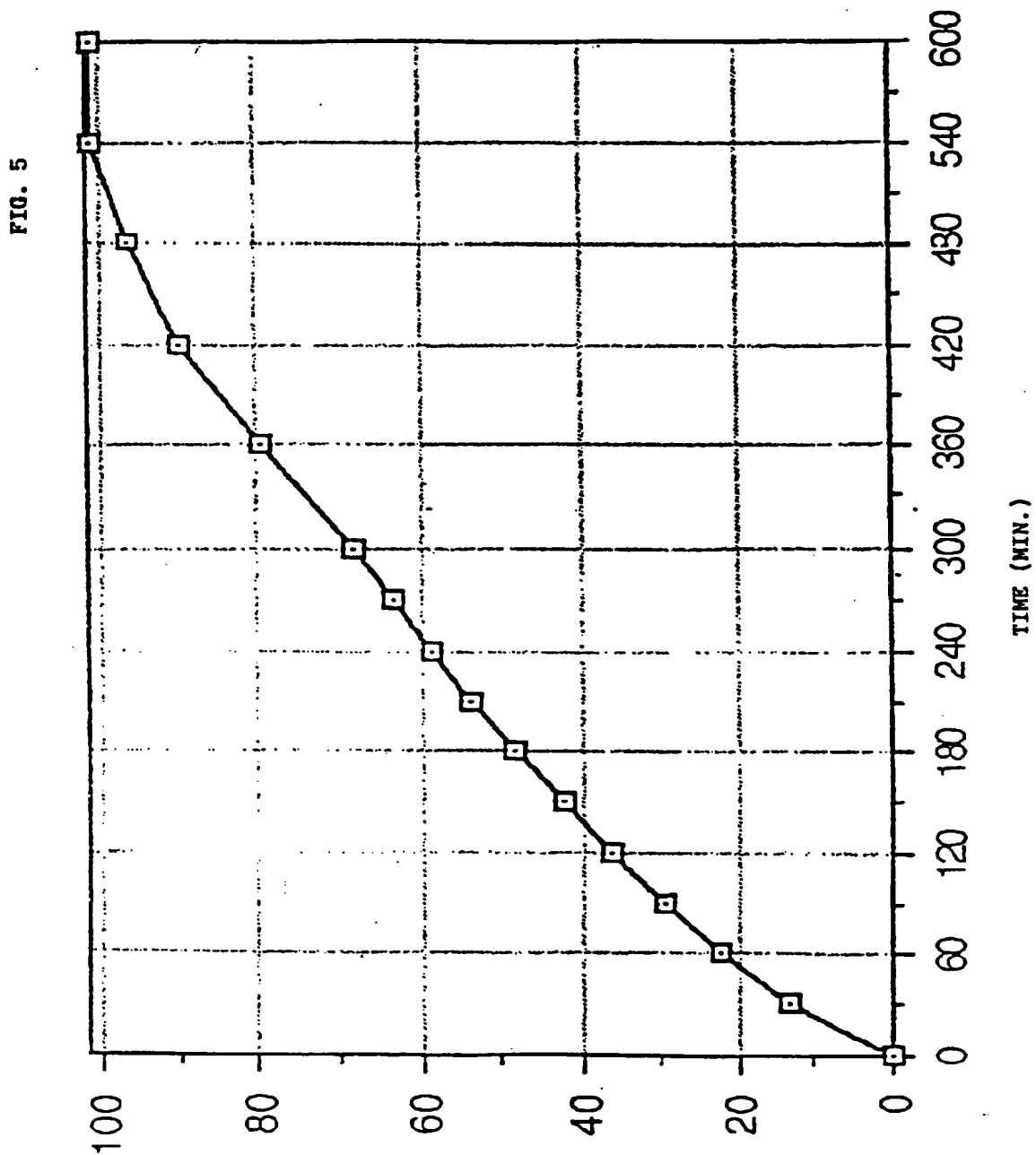
Fig. 2

- 2/5 -

FIG. 3

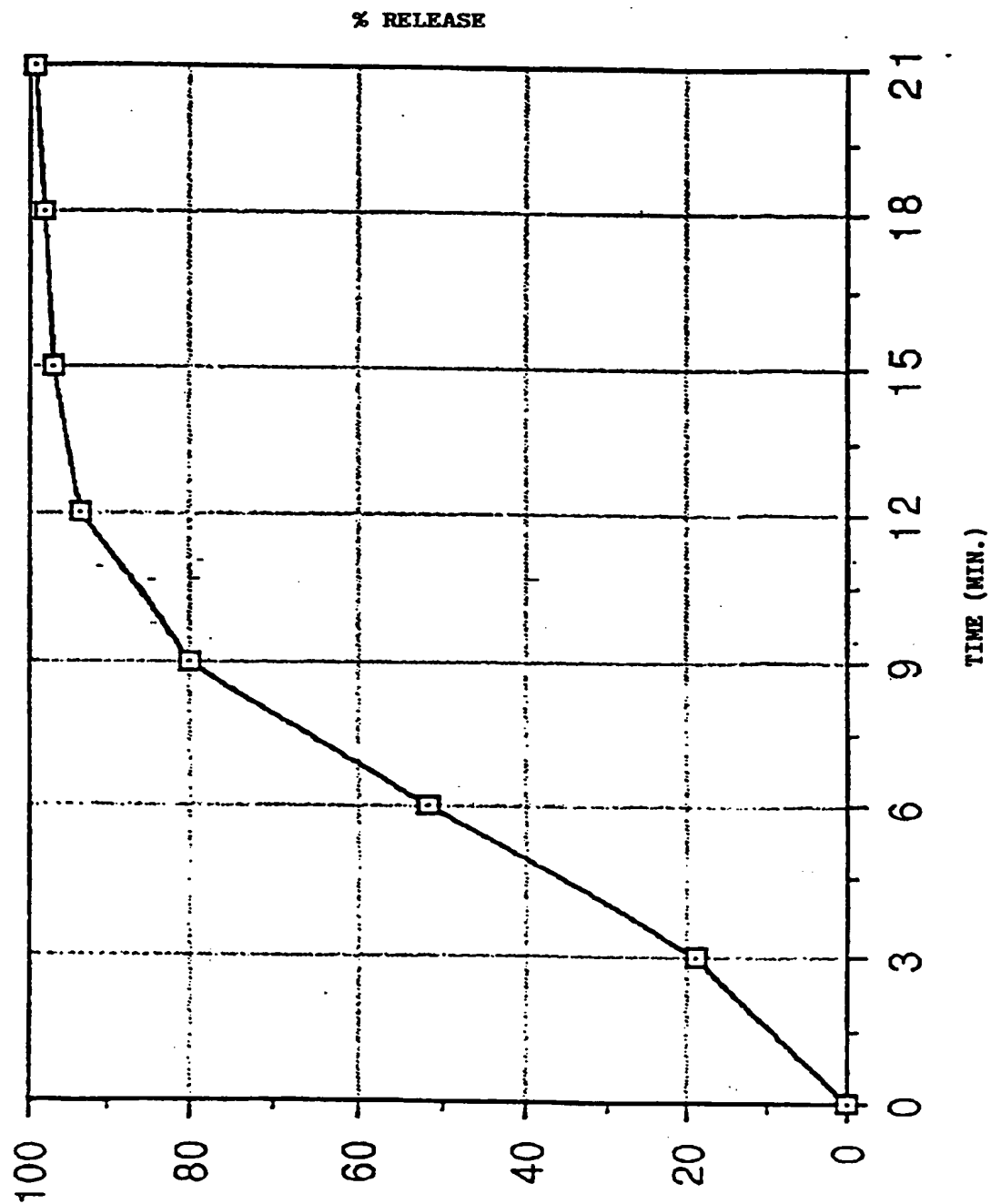


- 4/5 -

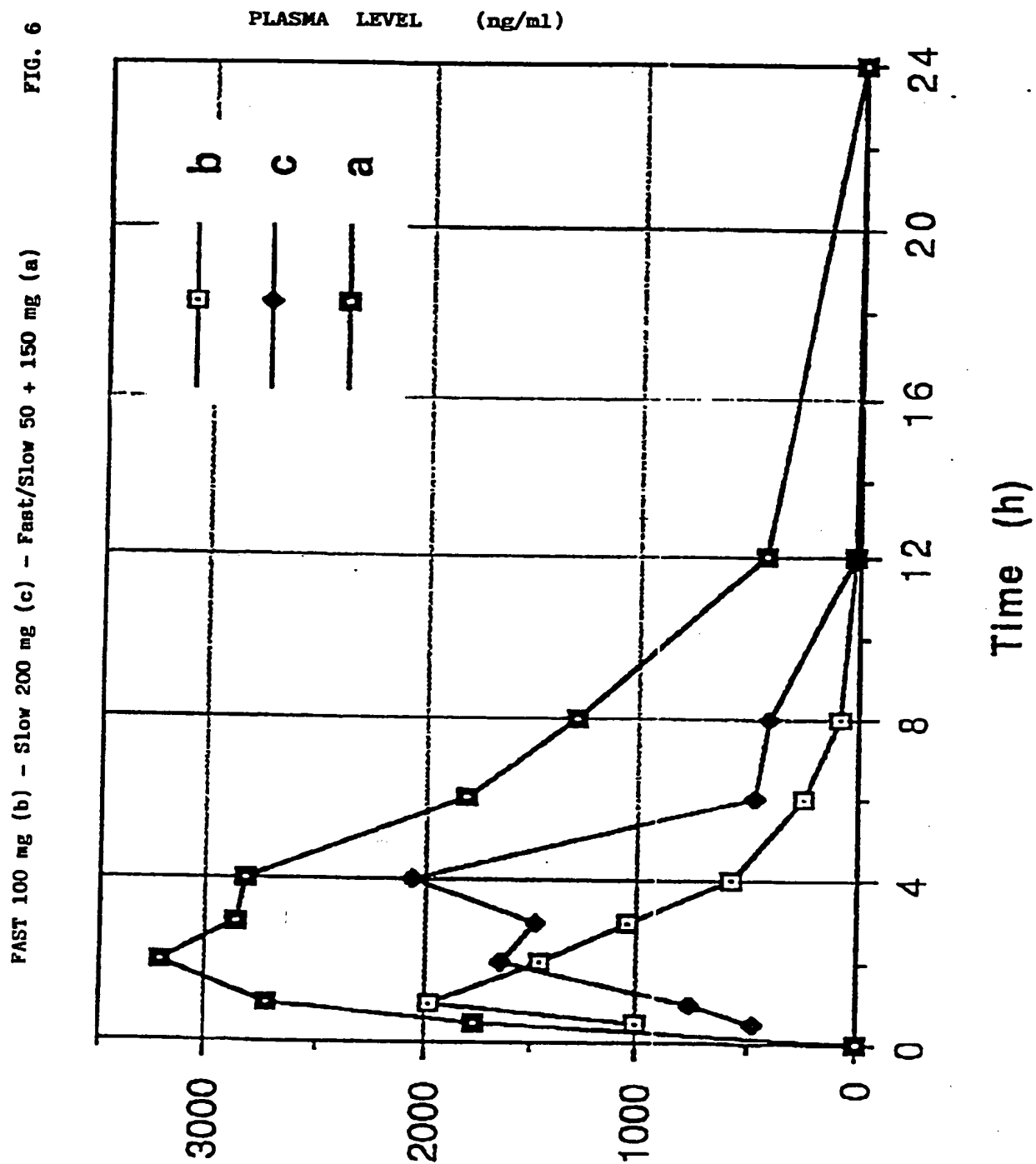


- 3/5 -

FIG. 4



- 5/5 -



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/EP 94/01050

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 05769 (M.MARVOLA) 1 April 1993 cited in the application see claims see page 3, line 11 - line 31 see examples	1,3,5,8, 12,17-19
X	WO,A,88 08299 (MCNEILAB INC.) 3 November 1988 see claims see examples	1-3, 7-10,12, 13,16-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 1994

Date of mailing of the international search report

12. 07 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Original Application No

PCT/EP 94/01050

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 384 514 (NORWICH EATON) 29 August 1990 cited in the application see claims see examples see page 4, line 12 - line 15 see page 4, line 36 - line 50 see page 5, line 6 - line 21 ---	1-3, 7-10,12, 13,17-21
X	EP,A,0 063 266 (BASF) 27 October 1982 cited in the application see claims see examples see page 4, line 24 - line 31 see page 5, line 1 - line 16 ---	1-3, 7-10,12, 15,17-19
X	US,A,2 993 836 (H.A.NASH) 25 July 1961 cited in the application see claims see example I see column 1, line 59 - line 64 see column 3, line 5 - line 10 ---	1-3, 7-10,12, 16-20
X	US,A,2 951 792 (J.V.SWINTOSKY) 6 September 1960 cited in the application see claims see examples see column 2, line 7 - line 11 see column 2, line 32 - line 54 see column 3, line 51 - line 62 ---	1-3, 10-12, 16-19
X	US,A,2 887 438 (J.COOPER) 19 May 1959 cited in the application see claims see examples see column 2, line 12 - line 18 see column 2, line 34 - line 42 see column 3, line 48 - line 54 ---	1,3,9, 11,12, 19,20
X	GB,A,2 230 185 (WARNER-LAMBERT) 17 October 1990 see claims see examples see page 5, line 13 - line 38 see page 6, line 9 - line 36 see page 7, line 1 - line 10 ---	1-3, 7-10,12, 13
1 1 X	GB,A,2 123 291 (LEPETIT) 1 February 1984 cited in the application see the whole document -----	1-3,5, 7-12

IN NATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Original Application No.

PCT/EP 94/01050

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9305769	01-04-93	CA-A- 2119158	01-04-93
WO-A-8808299	03-11-88	US-A- 4806359	21-02-89
		AU-B- 604110	06-12-90
		AU-A- 1477488	27-10-88
		AU-B- 603675	22-11-90
		AU-A- 1719788	02-12-88
		DE-A- 3865077	31-10-91
		DE-A- 3879080	15-04-93
		EP-A,B 0290168	09-11-88
		EP-A,B 0312581	26-04-89
		JP-A- 63280021	17-11-88
		JP-T- 1503070	19-10-89
		US-A- 5200193	06-04-93
EP-A-0384514	29-08-90	US-A- 5032406	16-07-91
		AU-B- 632793	14-01-93
		AU-A- 4997090	30-08-90
		CA-A- 2010037	21-08-90
		DE-D- 69004708	05-01-94
		DE-T- 69004708	24-03-94
		IL-A- 93424	27-02-94
		JP-A- 3200724	02-09-91
EP-A-0063266	27-10-82	DE-A- 3113901	28-10-82
		AU-B- 555093	11-09-86
		AU-A- 8238482	14-10-82
		CA-A- 1184497	26-03-85
		JP-A- 57175113	28-10-82
US-A-2993836		NONE	
US-A-2951792		NONE	
US-A-2887438		BE-A- 556141	
		FR-A- 1249216	
		GB-A- 837328	
		NL-C- 108838	
GB-A-2230185	17-10-90	US-A- 5085865	04-02-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/01050

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A-2230185		AU-B- 639231	22-07-93
		AU-A- 5314490	18-10-90
		CA-A- 2014418	12-10-90

GB-A-2123291	01-02-84	BE-A- 897221	05-01-84
		CA-A- 1216523	13-01-87
		DE-A- 3324209	12-01-84
		FR-A, B 2529784	13-01-84
		JP-A- 59027820	14-02-84
		NL-A- 8302416	01-02-84

71

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification⁴ : A61K 9/40, 9/22, 9/52	A1	(11) International Publication Number: WO 85/ 04100 (43) International Publication Date: 26 September 1985 (26.09.85)
(21) International Application Number: PCT/US85/00300 (22) International Filing Date: 22 February 1985 (22.02.85) (31) Priority Application Number: 591,738 (32) Priority Date: 21 March 1984 (21.03.84) (33) Priority Country: US (71) Applicant: AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION [US/US]; 685 Third Avenue, New York, NY 10017 (US). (72) Inventors: KALIDINDI, Sanyasi, Raju ; 36B Arlington Square Apartments, 1148 Mulberry Lane, Greenville, NC 27834 (US). GIANNINI, Robert, Peter ; 508 Meadowbrook Road, East Norriton, PA 19401 (US). GASKILL, James, Lawrence ; Apartment M-307, Sugartown and Avon Roads, Devon, PA 19333 (US). RUSSO, Emanuel, Joseph ; 8 Morris Circle, Wayne, PA 19087 (US).		(74) Agents: ROUTH, John, W. et al.; 685 Third Avenue, New York, NY 10017 (US). (81) Designated States: AU, DK, FI, JP, KR. Published <i>With international search report.</i>

(54) Title: SUSTAINED RELEASE PHARMACEUTICAL CAPSULES

(57) Abstract

A gastrointestinal, pH-independent, sustained-release pharmaceutical unit dosage form comprising a non-compressed mixture of a therapeutic agent and from about 10 to about 60 percent by weight of a high molecular weight hydroxypropylmethylcellulose, and a method for production thereof in hard gelatin capsules.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	GA	Gabon	MR	Mauritania
AU	Australia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BB	Barbados	HU	Hungary	NL	Netherlands
BE	Belgium	IT	Italy	NO	Norway
BG	Bulgaria	JP	Japan	RO	Romania
BR	Brazil	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Denmark	MG	Madagascar	US	United States of America
FI	Finland	ML	Mali		
FR	France				

-1-

**SUSTAINED RELEASE
PHARMACEUTICAL CAPSULES**

American Home Products Corporation, a Corporation organised and existing under the laws of the State of Delaware, United States of America of 685 Third Avenue, New York, New York 10017, United States of America.

Background of the Invention

The convenience and advantages of administering a single dose of medication which provides prolonged or sustained-release as opposed to the administration of a number of single doses at regular intervals are indisputable. Conventionally, sustained-release is achieved by controlling dissolution and/or diffusion of the medicament from the dosage form. Several carrier materials which are employed for this purpose include waxes, fatty materials, polymers, natural, synthetic and semi-synthetic gums, etc. Among the gums, hydroxypropylmethylcelluloses constitute an important class of materials because of their pH-independent effect as well as their synthetic origin as opposed to the natural gums such as alginates, Karaya, Guar, Locust bean, etc.

The use of hydroxypropylmethylcelluloses as carrier bases in sustained-action tablets has been well-established. For example, Christensen et al. (U.S. Patent 3,065,143) teach sustained-release tablets which contain a hydroxypropylmethylcellulose which, upon contact with gastric fluid, swells and forms a water-impermeable barrier on the tablet surface thereby providing sustained release by diffusion of drug through the barrier. It is clear from their teachings that the gum has to be pressed into a tablet for it to work as a sustained-action agent. Sheth et al. (U.S. Patent 4,167,558) disclose sustained-release tablets containing hydroxypropylmethylcellulose 60 HG. Again the dosage form is tablet and in addition there is a restriction on the density of the tablets to assure buoyancy and release the whole of the medicament in the stomach. Lowey et al. (U.S. Patent 3,870,790) disclose a solid, compressed buccal product containing low molecular weight hydroxypropylmethylcellulose which has been modified by humidification and air-drying. Similarly, Schor (U.S. Patent 4,226,849) disclosed the invention of tablets, lozenges, suppositories and/or other compressed dosage forms, which have prolonged-release wherein the hydroxypropylmethylcellulose has been subjected to hydrolysis and oxidation to generate a desired minimum concentration of carbonyl and carboxyl groups. The hydroxypropylmethylcellulose used in these teachings are of low molecular weight. In another patent (U.S. Patent 4,389,393) Schor et al. disclose the use of high molecular weight hydroxypropylmethylcelluloses in low concentrations for achieving sustained drug release action from compressed solid dosage forms. The hydroxypropylmethylcelluloses used by Schor et al. have a molecular weight above 50,000, a methoxyl content of 16-24% and hydroxypropoxyl content of 4-32%. Thus, Schor et al. (4,389,393) require that the material be compressed and it is clear from these teachings and those of Christensen et al.

(U.S. Patent 3,065,143), Sheth et al. (4,167,558), Lowey et al. (3,870,790) and Schor et al. (4,226,849 and 4,389,393) that compression is essential for the formation of a diffusion barrier layer on the surface of the oral dosage form to provide sustained action.

5 Sheth and Tossounian (U.S. Patent 4,126,672) showed that hydroxypropyl-methylcellulose provides sustained release in a buoyant capsule dosage form. However, because of the buoyancy constraints, the density of the capsules may have to be adjusted by the use of a fatty material so that the capsules float in the gastric fluid. It is clear from their teachings that floating is essential for their
10 concept to work. Henderson et al. (U.S. Patent 3,427,378) disclose capsules for sustained-release of medicament wherein a gum such as sodium alginate is incorporated into the pharmaceutical formulation in an amount of from 70 to 99 percent by weight and preferably 85 to 98 percent and the capsules are, as a critical feature, completely filled.

15

Description of the Invention

This invention provides a unit dosage form for administration of a therapeutic agent, which does not require expensive compression and granulation processing characteristic of the prior art sustained-release tablets, or density control re-
20 straints characteristic of the prior art capsules, while providing substantially the same slow drug release heretofore obtained with compressed tablets. The unit dosage form of this invention provides sustained release of drug independent of gastrointestinal pH and is therefore equally effective both in the stomach and intestine. By "independent," it is not meant that no change in dissolution rate occurs with change of pH, but that any change is so insubstantial that drug delivery
25 is not meaningfully altered.

In essence, it has been discovered that pharmaceutical compositions formulated with relatively high molecular weight hydroxypropylmethylcellulose (> 50,000) which heretofore have been employed in the production of compressed unit dosage forms such as tablets, buccal lozenges, suppositories, etc. may be used
30 without compression in hard gelatin capsules without loss of the sustained release effect observed in compressed tablets. Although the pharmaceutical literature has well documented the necessity for compressing hydroxypropylmethylcellulose-containing drug formulations to provide an external surface barrier to drug release, or for control of the density of an encapsulated drug formulation compounded with
35 hydroxypropylmethylcellulose to provide buoyancy and hold the capsule in the

- 4 -

stomach, applicants have found that neither of these preparative restrictions are necessary to provide a sustained release unit dosage capsule for administration. The formulations employed in this invention are not tailored to ensure buoyancy in gastric fluids and they are equally effective when administered in such manner as to be retained with a food bolus passing into the small intestine. No special attention or limitation as to internal porosity is required with the formulations of this invention.

Thus, in accordance with this invention, there is provided a gastrointestinal, pH-independent, sustained-release pharmaceutical unit dosage form comprising a hard gelatin capsule containing a pulverulent admixture of a therapeutically active medicament; from about 10 to about 60 percent by weight of at least one hydroxypropylmethylcellulose possessing a methoxy content of 16 to 24 weight percent, a hydroxypropoxyl content of 4 to 32 weight percent and a number average molecular weight of at least 50,000; and a pharmaceutically acceptable, nonpharmacologically functional adjuvant therefor.

The hydroxypropylmethylcelluloses employed in production of the sustained-release capsules are commercially available. In essence, any hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) possessing the characteristics of Methocel® K4M, K15M and K100M are applicable, individually and as mixtures. Each of these hydrophilic materials have a methoxy content of about 16 to about 24 weight percent, a hydroxypropyl content of about 4 to about 32 weight percent and a number average molecular weight of at least 50,000. The proportion of hydroxypropylmethylcellulose to total capsule weight may vary from about 10 to about 60 percent to provide release rates of drug over a 6 to about 12 hour period. Although the release rates achieved with hard gelatin capsules containing drug formulations and hydroxypropylmethylcellulose in accordance with this invention will differ somewhat depending upon the specific drug being compounded, the sustained release effect is readily achieved. Modification of the release rate may be attained by altering the hydroxypropylmethylcellulose to drug ratio within the limits indicated above. Generally, an increased content of hydroxypropylmethylcellulose will prolong the release rate of a given drug as may be seen from the experimental data presented, infra. An optimum release rate is obtained when near total dissolution of the therapeutic agent at a substantially uniform rate is achieved over a period of from six to twelve hours and preferably in about eight hours.

Any therapeutic agent suitable for oral administration may be formulated in conformance with this disclosure and encapsulated to provide a sustained release

- 5 -

unit dosage capsule. Thus, tranquilizers, analgesics, antihypertensives and similar drugs may be readily formulated for use in sustained release capsule form.

In addition to the therapeutic agent and hydroxypropylmethylcellulose, other conventional additives such as fillers and binders (microcrystalline cellulose, lactose, dicalcium phosphate dihydrate, etc.); lubricants (magnesium stearate, stearic acid, etc.); glidants (colloidal silicon dioxide, talc, etc.); hydrophilic gums (methylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxyethylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, etc.); disintegrants (starch, sodium starch glycolate, etc.); preservatives (methylparahydroxy benzoate, benzoic acid, etc.); antioxidants (ascorbic acid, sodium bisulfite, etc.) and colorants (certified dyes) may be employed in the formulations for filling hard gelatin capsules without materially changing the sustained release rate of medicament achieved with the indicated high molecular weight hydroxypropylmethylcellulose material.

The pharmaceutical compositions of this invention are prepared by blending an admixture of the ingredients and filling hard gelatin capsules therewith by hand or machine. Where the particulate size of any one component of the composition, or the mixture in its entirety, is of such size as to detract from the production of a homogeneous or near homogeneous blend for subsequent processing, or the desired performance of the finished dosage form (e.g. dissolution, stability, uniformity, weight variation, etc.), that component or the entire mixture may be milled to any desired size prior to a final blending and capsule filling.

The following examples illustrate several specific formulations for filling hard gelatin capsules to produce sustained release doses of the indicated therapeutic agents. For purposes of this illustration, the drugs used were:

25	<u>Oxazepam</u>	7-chloro-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one;
	<u>Ciramadol</u>	1-cis-2-(α -dimethylamino-m-hydroxybenzyl)cyclohexanol;
	<u>Guanabenz</u>	(E)-[(2,6-dichlorobenzylidene)amino]guanidine; and
30	<u>Lorazepam</u>	7-chloro-5-(o-chlorophenyl)-1,3-dihydro-3-hydroxy-2H-1,4-benzodiazepin-2-one.

- 6 -

Example 1Hydroxypropylmethylcellulose 10 percent

		<u>mg</u>
	Oxazepam USP	30.00
5	Hydroxypropylmethylcellulose 2208 USP	37.50
	Microcrystalline Cellulose NF	94.00
	Lactose USP Hydrous	206.75
	Colloidal Silicon Dioxide NF	3.75
	Magnesium Stearate NF	3.00
		<hr/>
10	<u>TOTAL</u>	375.00

Example 2Hydroxypropylmethylcellulose 20 percent

		<u>mg</u>
	Oxazepam USP	30.00
15	Hydroxypropylmethylcellulose 2208 USP	75.00
	Microcrystalline Cellulose NF	94.00
	Lactose USP Hydrous	169.25
	Colloidal Silicon Dioxide NF	3.75
	Magnesium Stearate NF	3.00
		<hr/>
20	<u>TOTAL</u>	375.00

Example 3Hydroxypropylmethylcellulose 30 percent

		<u>mg</u>
	Oxazepam USP	30.00
25	Hydroxypropylmethylcellulose 2208 USP	112.00
	Microcrystalline Cellulose NF	94.00
	Lactose USP Hydrous	131.75
	Colloidal Silicon Dioxide NF	3.75
	Magnesium Stearate NF	3.00
		<hr/>
30	<u>TOTAL</u>	374.50

- 7 -

Example 4Hydroxypropylmethylcellulose 25 percent

		<u>mg</u>
	Ciramadol Hydrochloride	68.80
5	Hydroxypropylmethylcellulose 2208 USP	112.50
	Microcrystalline Cellulose NF	110.26
	Lactose USP Hydrous	152.27
	Colloidal Silicon Dioxide NF	4.50
	Magnesium Stearate NF	1.67
10	<u>TOTAL</u>	450.00

Example 5Hydroxypropylmethylcellulose 60 percent

		<u>mg</u>
	Guanabenz Acetate	20.20
15	Hydroxypropylmethylcellulose 2208 USP	90.00
	Lactose USP Hydrous	39.05
	Magnesium Stearate NF	0.75
	<u>TOTAL</u>	150.00

Example 6Hydroxypropylmethylcellulose 40 percent

		<u>mg</u>
	Lorazepam	2.00
	Hydroxypropylmethylcellulose 2208 USP	40.00
	Microcrystalline Cellulose NF	30.00
25	Lactose USP Hydrous	27.50
	Magnesium Stearate NF	0.50
	<u>TOTAL</u>	100.00

- 8 -

In each of the preceding examples, all the ingredients were mixed together in a Twin-shell® blender for 10 minutes, milled through a Fitz Mill®, and mixed again for 10 minutes in the same blender. The blend was then filled into hard gelatin capsules using a Zanasi LZ64 capsule-filling machine.

5 The above formulations provide sustained-release for 6-12 hours in vitro as shown in Table I. The dissolution rate study employed to obtain the data reported in Table I was performed in an apparatus conforming to that described as Apparatus 2 in U.S. Pharmacopeia XX page 959 (1980) by the method therein described, at 50 r.p.m. or 100 r.p.m. The dissolution medium was 500 ml 0.1N HCl
10 for the first hour after which 500 ml phosphate buffer was added to afford a pH of 7.4, comparable to that found in the intestine. A spring coil was employed to sink the capsules and insure that they did not float.

15 Table I: Dissolution Data for Various Sustained-Action Capsules
 Containing Hydroxypropylmethylcellulose Carrier Base.
 (% Drug Dissolved as an Average of Six Capsules)

<u>Formulation of</u>							
<u>Example No.</u>		<u>1 Hour</u>	<u>2 Hours</u>	<u>4 Hours</u>	<u>6 Hours</u>	<u>8 Hours</u>	<u>12 Hours</u>
	1	20	57	90	97	-	-
	2	26	56	79	86	88	94
20	3	15	36	55	69	79	92
	4	37	60	82	95	100	-
	5	28	47	68	84	93	94
	6	20	32	50	67	82	94

25 To illustrate the comparable dissolution rates between compressed tablets and the capsules of this invention employing the same formulation, the following data was obtained with the appropriate formulations disclosed, supra, and with that of Example 7.

- 9 -

Example 7Hydroxypropylmethylcellulose 38.6 percent

	Guanabenz Acetate	20.2 mg
	Hydroxypropylmethylcellulose 2208, USP	61.7 mg
5	Magnesium stearate, NF	0.55 mg
	Microcrystalline cellulose, NF	22.0 mg
	Lactose, USP	45.6 mg
	Sodium starch glycolate, NF	10.0 mg
	<u>TOTAL</u>	<u>160.0 mg</u>

- 10 The tablets were conventionally prepared and the capsules were prepared by machine-filling as described, supra. The procedure followed in obtaining this dissolution rate data was the same as that disclosed, supra, except that the study employing guanabenz were run in all acid (0.1N HCl) without addition of buffer, and all samples were run at a paddle speed of 50 RPM.

- 15 Table II: Dissolution Data Comparing Tablets and Capsules Prepared With the Same Powder Blend or Granulation.
(% Dissolved as an Average of Six Capsules and Tablets)

20	Time (Hours)	Oxazepam with 20% HPMC 2208 USP		Guanabenz with 38.6% HPMC 2208 USP		Ciramadol with 25% HPMC 2208 USP	
		Tablets	Capsules	Tablets	Capsules	Tablets	Capsules
	1	12.5	13.5	35.0	37.5	26.5	37
	2	22.5	22.5	52.0	56.0	41.5	60
	4	33.0	32.0	77.0	80.0	57.5	82
25	6	40.0	39.0	93.0	92.0	75.0	95
	8	46.0	46.0	93.0	98.0	85.0	complete
	10	52.5	52.0	95.5	98.0	93.5	complete
	12	56.5	55.5	97.0	96.0	96.5	complete

- 10 -

To demonstrate that there is no property imparted to the capsules of this invention by the encapsulating machine, the data presented in Table III compares the dissolution rate of hand-filled capsules with those containing the same formulations when filled with a Zanasi LZ64 encapsulating machine. The formulations employed were those shown in Examples 2 and 6.

Table III: Dissolution of Hand-Filled and Machine-Filled Capsules
(% Dissolved as an Average of Six Capsules)

10	Time (Hours)	<u>Oxazepam (Example 2)</u>		<u>Lorazepam (Example 6)</u>	
		<u>Hand filled</u>	<u>Machine filled</u>	<u>Hand filled</u>	<u>Machine filled</u>
	1	17	26	24	20
	2	44	56	37	32
	4	68	79	55	50
	6	80	86	71	67
15	8	81	88	88	82
	12	84	94	99	94
	20	91	98	100	94

From these data, the preferred quantity of defined hydroxypropylmethylcellulose for general incorporation into pharmaceutical formulations for encapsulation can be seen to be from about 10 to about 50 weight percent. For the individual drugs herein exemplified the preferred quantity of defined hydroxypropylmethylcellulose is from about 15 to about 40 weight percent with oxazepam; about 20 to about 50 weight percent with lorazepam and from about 15 to about 50 weight percent with ciramadol.

Thus, the advantages of capsule dosage forms with no loss of sustained drug-release rate presently found in compressed tablets, clearly characterizes the benefits of this invention.

CLAIMS

1. A gastrointestinal pH independent sustained release pharmaceutical unit dosage form comprising a hard gelatin capsule containing a pulverulent admixture of a therapeutically active medicament; from about 10 to about 60 percent by weight of at least one hydroxypropylmethylcellulose possessing a methoxy content of 16 to 24 weight percent, a hydroxypropoxyl content of 4 to 32 weight percent and a number average molecular weight of at least 50,000; and a pharmaceutically acceptable, nonpharmacologically functional adjuvant therefor.

2. A pharmaceutical unit dosage form of Claim 1 in which said hydroxypropylmethylcellulose is present in an amount of from about 10 to about 50 percent by weight.

3. A sustained-release pharmaceutical composition in capsule form as claimed in Claim 1 for oral administration of oxazepam, which comprises a pharmaceutically effective amount of oxazepam admixed with a hydroxypropylmethylcellulose wherein said hydroxypropylmethylcellulose has a methoxyl content of about 16-24 percent, a hydroxypropoxyl content of about 4-32 percent and an average number molecular weight above 50,000 and said hydroxypropylmethylcellulose represents between about 10 to about 60 weight percent of the contents of said capsule.

4. A pharmaceutical composition in capsule form as claimed in Claim 3 in which said hydroxypropylmethylcellulose represents between about 15 to about 40 percent of the contents of said capsule.

5. A sustained-release pharmaceutical composition in capsule form as claimed in Claim 1 for oral administration of lorazepam, which comprises a pharmaceutically effective amount of lorazepam admixed with a hydroxypropylmethylcellulose wherein said hydroxypropylmethylcellulose has a methoxyl content of about 16-24 percent, a hydroxypropoxyl content of about 4-32 percent and an average number molecular weight above 50,000 and said hydroxypropylmethylcellulose represents between about 10 to about 60 weight percent of the contents of said capsule.

- 12 -

6. A pharmaceutical composition in capsule form as claimed in Claim 5 in which said hydroxypropylmethylcellulose represents between about 20 to about 50 percent of the contents of said capsule.

5 7. A sustained-release pharmaceutical composition in capsule form as claimed in Claim 1 for oral administration of ciramadol, which comprises a pharmaceutically effective amount of ciramadol admixed with a hydroxypropyl-methylcellulose wherein said hydroxypropylmethylcellulose has a methoxyl content of about 16-24 percent, a hydroxypropoxyl content of about 4-32 percent and an average number molecular weight above 50,000 and said hydroxypropylmethyl-
10 cellulose represents between about 10 to about 60 weight percent of the contents of said capsule.

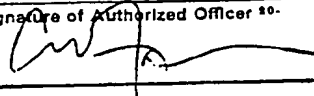
8. A pharmaceutical composition in capsule form as claimed in Claim 7 in which said hydroxypropylmethylcellulose represents between about 15 to about 50 percent of the contents of said capsule.

15 9. A sustained-release pharmaceutical composition in capsule form as claimed in Claim 1 for oral administration of guanabenz, which comprises a pharmaceutically effective amount of guanabenz admixed with a hydroxypropyl-methylcellulose wherein said hydroxypropylmethylcellulose has a methoxyl content of about 16-24 percent, a hydroxypropoxyl content of about 4-32 percent and an
20 average number molecular weight above 50,000 and said hydroxypropylmethyl-cellulose represents between about 10 to about 60 weight percent of the contents of said capsule.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US85/003001

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC ⁸⁴		
A61K 9/40, A61K 9/22. A61K 9/52		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
US	424/37, 19	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ⁶	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
Y	US, A, 3,065,143 to Christenson, Published 20 Nov. 1962	1-9
Y	US, A, 3,870,790 to Lowey <u>et al.</u> , published 11 March 1975	1-9
X, Y	US, A, 4,126,672 to Sheth <u>et al.</u> , published 21 Nov. 1978	1-9
Y	US, A, 4,167,558 to Sheth <u>et al.</u> , published 11 Sept. 1979	1-9
X, Y	US, A, 4,173,626 to Dempski <u>et al.</u> , published 6 Nov. 1979	1-9
Y	US, A, 4,226,849 to Schor, published 7 Oct. 1980	1-9
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹	Date of Mailing of this International Search Report ²	
5 May 1985	13 MAY 1985	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ¹⁰	
IS/US		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No ¹⁸
Y	US, A, 4,389,393 to Schor <u>et al.</u> , published 21 June 1983	1-9
P, X, Y	US, A, 4,478,819 to Hercelin <u>et al.</u> , published 23 Oct. 1984	1-9

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification⁶: C12N 15/55, 9/78, 9/80, 15/71, 1/21, C12P 21/02 // (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) International publication number: WO 99/64607 (43) International publication date: 16 December 1999 (16.12.99)
(21) International application number: PCT/FR99/01343 (22) International filing date: 8 June 1999 (08.06.99) (30) Data relating to the priority: 98/07,474 10 June 1998 (10.06.98) FR (71) Applicant (for all designated States except US): RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE [FR/FR]; 42, avenue Aristide Briand, F-92160 Antony (FR). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): PIERRARD, Jérôme [FR/FR]; 3, rue Hector Berlioz, F-69009 Lyon (FR). GUITTON, Carole [FR/FR]; 23, rue du Petit Montessuy, F-69009 Lyon (FR). FAVRE-BULLE, Olivier [FR/FR]; 113, rue Baraban, F-69003 Lyon (FR). (74) Representative: TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).	(81) Designated states: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published With the International Search Report. Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.	
<p style="text-align: center;">As printed</p> (54) Title: INDUSTRIAL METHOD FOR PRODUCING HETEROLOGOUS PROTEINS IN <i>E. COLI</i> AND STRAINS USEFUL FOR SAID METHOD (54) Titre: PROCEDE INDUSTRIEL DE PRODUCTION DE PROTEINES HETEROLOGUES CHEZ <i>E. COLI</i> ET SOUCHES UTILES POUR LE PROCEDE (57) Abstract The invention concerns an industrial method for preparing heterologous proteins in <i>E. coli</i> , which consists in seeding and cultivating in an appropriate culture medium <i>E. coli</i> bacteria modified with an appropriate system for expressing heterologous proteins, characterised in that the <i>E. coli</i> strain is an <i>E. coli</i> W strain. (57) Abrégé La présente invention concerne un procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans <i>E. coli</i> , dans lequel onensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries <i>E. coli</i> modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de <i>E. coli</i> est une souche <i>E. coli</i> W.		



ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia-Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Vietnam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Ivory Coast	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

PROCEDE INDUSTRIEL DE PRODUCTION DE PROTEINES HETEROLOGUES
CHEZ *E. COLI* ET SOUCHES UTILES POUR LE PROCEDE

5 La présente invention concerne un nouveau procédé industriel de production de protéines hétérologues chez *E. coli*. Si pour certaines protéines hétérologues à très haute valeur ajoutée le prix de revient de leur procédé de préparation reste un facteur négligeable par rapport à la finalité de la protéine hétérologue (dans le domaine pharmaceutique notamment), le développement de la production industrielle de
10 protéines hétérologues de moindre valeur ajoutée dans *E. coli* passe par la prise en compte de facteurs de production tels que la nécessité d'avoir une biomasse élevée et une très forte teneur en protéines hétérologues produites pour un coût le plus bas possible, lequel coût doit tenir compte de la nature du milieu, du rendement énergétique et en réactifs, et des conditions opératoires. Pour des productions
15 industrielles avec des volumes réactionnels pouvant atteindre plusieurs dizaines de m³, on cherchera les milieux et les conditions opératoires les plus simples possibles. La présente invention consiste en la sélection d'une souche de *E. coli* appropriée pour répondre aux conditions ci-dessus, essentielles à la production industrielle économiquement satisfaisante de protéines hétérologues, indépendamment de la valeur
20 de la protéine produite.

Les souches d'*E. coli* les plus couramment utilisées pour les travaux de biologie moléculaire dérivent de la souche K12 (Swartz, 1996, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, ASM Press Washington, pp1693-1711). Des dérivés d'*E. coli* B, tels que BL21, sont également utilisés pour la
25 production de protéines à cause de leur propriétés physiologiques. Un tableau des souches les plus couramment utilisées pour la production de protéines recombinantes est donné par Wingfield, 1997 (Current Protocols in Protein Science, Coligan *et al.* Ed, John Wiley & Sons, Inc, 5.0.1-5.0.3).

De nombreux systèmes d'expression de protéines chez des hôtes bactériens ont
30 été décrits (Makrides, 1996, Microbiol. Rev. 60:512-538; Current Opinions in Biotechnology, 1996, 7). Un système d'expression est constitué d'un promoteur, de son régulateur, d'un site de fixation du ribosome suivi d'un site de restriction permettant l'insertion du gène d'intérêt, d'une structure pouvant servir de terminateur de

transcription, éventuellement de gènes dont la coexpression augmentent la qualité de la protéine d'intérêt surexprimée et d'un ou plusieurs vecteurs permettant d'introduire dans l'hôte ces combinaisons.

Le promoteur doit présenter au moins trois caractéristiques pour être utilisé dans un procédé de production de protéines (Makrides, 1996, précité) :

- il doit être fort et conduire à l'accumulation de la protéine d'intérêt qui peut représenter 10 à 50 % des protéines totales de la cellule hôte;
- il doit pouvoir être régulé de façon pouvoir autant que possible découpler la phase de production de biomasse de la phase de production de la protéine;
- il doit être inductible (passage d'un niveau de faible activité transcriptionnelle à un niveau maximal d'activité transcriptionnelle) avec des conditions de procédé simples et bon marché.

De nombreux promoteurs ont été décrits pour l'expression chez *E. coli* (Makrides, 1996, précité; Weickert *et al.*, 1996, Current Opinions in Biotechnology 7 : 494-499). Parmi les promoteurs homologues utilisés pour la production de protéines chez *E. coli*, on peut citer les promoteurs *lac*, *trp*, *lpp*, *phoA*, *recA*, *araBAD*, *proU*, *cst-I*, *tetA*, *cadA*, *nar*, *tac*, *trc*, *lpp-lac*, *Psyn*, *cspA*. Parmi les promoteurs hétérologues utilisés pour la production de protéines chez *E. coli*, on peut citer les promoteurs *PL*, *PL-9G-50*, *PR-PL*, *T7*, *λPL-PT7*, *T3-lac*, *T5-lac*, *T4 gene 32*, *nprM-lac*, *VHb*, *Proteine A*. Un certain nombre d'inconvénients sont liés à ces promoteurs. On peut citer pour certains d'entre-eux l'utilisation de l'IPTG comme molécule inductrice, dont le prix peut représenter plus de 14 % du coût du milieu. D'autres utilisent une régulation par la température, difficile à mettre en œuvre à l'échelle d'un fermenteur industriel de 100 m³.

Les vecteurs les plus couramment utilisés pour l'expression de protéines chez *E. coli* dérivent du plasmide pBR322 (Swartz, 1996, précité; Makrides, 1996, précité). Ils sont présents dans les cellules à un certain nombre de copies, déterminé par l'interaction de deux ARN codés par le plasmide, RNAI et RNAII (Polisky, 1988, Cell 55 : 929-932). L'interaction de l'ARNI avec l'ARNII inhibe la maturation de l'ARNII en une forme nécessaire à l'initiation de la réplication du plasmide. Cette interaction est modulée par la protéine ROP dont le gène est présent sur pBR322 mais pas sur certains dérivés tels que les plasmides de type pUC (Lin-Chao et Cohen, 1991, Cell 65 : 1233-1242). En matière de régulation du nombre de copies du plasmide d'expression chez *E. coli*, plusieurs stratégies sont citées (Swartz, 1996, précité; Makrides, 1996, précité).

On retiendra notamment qu'un fort nombre de copies de plasmide d'expression conduit à un niveau élevé d'ARN messagers de la protéine désirée, mais peut être pénalisant pour le métabolisme de la souche hôte (Bailey, 1993, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 48 : 29-52).

5 La stabilité des plasmides d'expression est un critère important d'autant plus que les fermentations industrielles tendent à ne pas utiliser d'antibiotiques dans les fermenteurs. Plusieurs stratégies ont été développées pour stabiliser les plasmides d'expression dont le clonage du locus *cer* du plasmide naturel ColE1. Ce locus a été caractérisé (Leung *et al.*, 1985, DNA 4 : 351-355) et son insertion sur des plasmides
10 multi-copies a été décrite comme ayant un effet bénéfique sur la stabilité de ces plasmides (Summers et Sherratt, 1984, Cell 36 : 1097-1103).

Si les souches et les systèmes d'expression ci-dessus permettent d'obtenir de bons rendements de production de protéines hétérologues, leur emploi reste limité à la production de protéines hétérologues à très haute valeur ajoutée pour lesquelles le prix
15 de revient du système de production (souche bactérienne, milieu et conditions de culture, matières premières) est minime comparé à la valeur de la protéine produite. Comme exemples de telles protéines à très haute valeur ajoutée, on trouve plus particulièrement les protéines hétérologues destinées à un usage pharmaceutique comme
20 par exemple l'hormone humaine de croissance, l'interféron humain consensus alpha, les interleukines humaines 1 β , α 1, 2, l'interféron leucocytaire humain, l'hormone parathyroïdique humaine, l'insuline humaine, l'albumine sérique humaine, la Proapolipoprotéine humaine A-1 (Lee, 1996, Trends in Biotechnol. 14:98-105 ; Latta *et al.*, 1987, Bio/Technology 5 :1309-1313).

Toutefois, pour la production d'intermédiaire chimique de masse (Lee, 1997, Nature Biotech. 15 :17-18) ou pour la production d'enzymes à usage industriel,
25 notamment des catalyseurs nécessaires à la production de composés chimiques, le prix de revient du système de production devient un facteur dominant à prendre en considération pour évaluer l'intérêt technique du dit système.

Pour la production de protéines hétérologues dans des bactéries, la productivité
30 du système de culture employé peut être significativement augmentée en utilisant des stratégies de culture à haute densité cellulaire (S. Makrides, 1996, précité; Wingfield, 1997, précité). Parmi celles-ci se trouve la stratégie de fed-batch (Jung *et al.*, 1988, Ann. Inst. Pasteur /Micrbiol. 139 : 129-146 ; Kleman *et al.*, 1996, Appl. Environ. Microbiol.

62 : 3502-3507 ; Lee, 1996, précité ; Bauer et White, 1976, *Biotechnol. Bioeng.* 18 : 839-846). Cette stratégie, combinée à l'utilisation d'un promoteur *P_{trp}*, a permis d'atteindre des productivités importantes : 55 g de poids sec par litre et 2,2 g de protéine hétérologue par litre (Jung *et al.*, 1988, précité). Il est fait état de productions en routine
5 de 35 à 50 g de poids sec par litre (Wingfield, 1997, précité).

Cependant, les souches et systèmes ci-dessus ne permettent pas d'obtenir des densités de culture suffisantes pour la production industrielle de protéines hétérologues dont la valeur (prix de revient) doit être négligeable au regard de leur finalité (notamment pour la préparation de catalyseurs biologiques).

10 La présente invention réside dans la sélection d'une souche de *E. coli* particulière, appropriée pour la production industrielle de protéines hétérologues. La souche utile pour le procédé selon l'invention est une souche *E. coli* W, plus particulièrement la souche W référencée à l'ATCC sous le numéro 9637.

Cette souche W (ATCC 9637), est bien connue et décrite dans de nombreuses
15 publications (Davies & Mingioli, 1950, *J. Bact.*, 60: 17-28 ; Doy et Brown, 1965, *Biochim. Biophys. Acta*, 104: 377-389 ; Brown et Doy, 1966, *Biochim. Biophys. Acta*, 118: 157-172 ; Wilson & Holden, 1969, *J. Biol. Chem.*, 244: 2737-2742 ; Wilson & Holden, 1969, *J. Biol. Chem.*, 244: 2743-2749 ; White, 1976, *J. Gen. Microbiol.*, 96: 51-62 ; Shaw & Duncombe, 1963, *Analyt.* 88: 694-701 ; Br. Pharmacopoeia, 1993, 2: A164-A169 ; Huang *et al.*, US 3,088,880; Hamsher *et al.*, US 3,905,868; Takahashi *et al.*, US 3,945,888; Huang *et al.*, US 3,239,427; Burkholder, 1951, *Science*, 114: 459-460 ; Prieto *et al.*, 1996, *J. Bact.*, 178: 11-120 ; Lee 1996, précité; Lee & Chang, 1995, *Can. J. Microbiol.* 41: 207-215; Lee *et al.*, 1994, *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 1337-1347 ; Lee & Chang, 1993, *Biotechnology Letters*, 15: 971-974; Bauer et White, 1976, précité;
25 Bauer et Shiloach, 1974, *Biotechnol. Bioeng.* 16: 933-941 ; Gleiser et Bauer, 1981, *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 1015-1021 ; Lee et Chang, 1995, *Advances in Biochem. Engine./Biotech.* 52 : 27-58). La souche W (ATCC9637) a ainsi été utilisée pour la production d'acide 3-polyhydroxybutyrique (PHA) après introduction d'un plasmide portant l'opéron d'*Alcaligenes eutrophus* codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PHA (Lee et Chang, 1993, précité; Lee et Chang, 1995, précité ; Lee *et al.*, 1994).
30

La souche W a aussi été utilisée en cultures à haute densité cellulaire (Bauer et White, 1976, précité; Bauer et Shiloach, 1974, précité ; Gleiser et Bauer, 1981, précité ;

Lee et Chang, 1993, précité ; Lee et al., 1997, *Biotechnology Techniques* 11 : 59-62). Des biomasses de 125 g de poids sec par litre ont ainsi pu être obtenues (Lee et Chang, 1993, précité) en utilisant du saccharose comme source carbonée.

Toutefois, cette souche n'a jamais été décrite pour la production de protéines recombinantes. En outre, en combinant un plasmide portant l'opéron d'*Alcaligenes eutrophus* codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PHA et une stratégie de culture à haute densité cellulaire de la souche W recombinante correspondante, Lee et Chang (1993, précité) ont obtenu de moins bonnes productivité de PHA qu'avec une souche XL1-Blue dérivée de la souche K12 (Lee et Chang, 1995, précité ; Lee, 1996, précité).

La présente invention concerne donc un procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans *E coli*, dans lequel onensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries *E coli* modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de *E. coli* est une souche *E. coli* W. Plus préférentiellement la souche W est la souche W déposée à l'ATCC sous le numéro 9637.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche W est un dérivé de la souche déposée à l'ATCC sous le numéro 9637 obtenu par sélection clonale ou manipulation génétique.

Par procédé industriel, on entend selon l'invention tout procédé dont le volume de culture des bactéries est supérieur au volume de culture usuel employé dans les laboratoires de recherche. De manière générale, on entend par procédé industriel tout procédé pour lequel le volume de culture est supérieur à 2 litres, de préférence supérieur ou égal à 10 litres, plus préférentiellement supérieur ou égal à 20 litres, encore plus préférentiellement supérieur ou égal à 50 litres. Le procédé selon l'invention est particulièrement approprié pour des volumes de culture de plusieurs dizaine de m³, jusqu'à plus de 100 m³.

Le milieu de culture approprié est un milieu de culture approprié pour l'obtention d'une forte densité de biomasse et une forte teneur en protéines hétérologues produites. Plusieurs types de milieux (définis, complexes et semi-définis) peuvent être utilisés pour la culture à haute densité cellulaire (Lee, 1996, précité). Si les milieux connus de l'état de la technique et en particulier les milieux semi-définis permettent de cumuler une bonne reproductibilité de la composition du milieu et une bonne

productivité de la culture (Lee, 1996, précité) le développement d'un tel milieu requiert toutefois une optimisation empirique pour la prise en compte des contraintes économiques énoncées auparavant (Lee, 1996, précité).

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le milieu de culture
5 comprend du saccharose comme principale source de carbone. Par principale source de carbone, on entend selon l'invention que le saccharose représente au moins 50 % en poids du poids total des sources de carbone du milieu de culture, plus préférentiellement au moins 75 % en poids, encore plus préférentiellement au moins 85 % en poids. Selon un mode plus préférentiel de réalisation de l'invention, le milieu de culture ne comprend
10 substantiellement que du saccharose comme source de carbone. Il est entendu que pour le procédé selon l'invention, le milieu de culture peut comprendre des additifs appropriés de manière à augmenter le rendement global de l'invention. Ces additifs peuvent avoir comme fonction annexe de se comporter comme source de carbone à la culture des bactéries. Toutefois, ces additifs ne seront pas considérés comme source de
15 carbone au sens de la présente invention si les bactéries *E coli* W employées dans le procédé selon l'invention ne peuvent croître sur lesdits additifs comme seule source de carbone.

De manière avantageuse, la quantité de saccharose dans le milieu de culture du procédé selon l'invention est comprise entre 0,1 et 300 g/l en début de culture (avant
20 l'ensemencement), de préférence entre 0,5 et 200 g/l. Il est entendu que le saccharose constituant la principale source de carbone du milieu selon l'invention, la quantité de saccharose ira diminuant au cours du procédé. En général, en fin de réaction la quantité de saccharose dans le milieu de culture en fin de réaction est comprise entre 0 et 10 g/l.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le milieu de culture
25 approprié comprend en outre une source d'azote organique complémentaire. Cette source d'azote organique complémentaire peut être constituée par toutes les sources d'azote organique connues de l'homme du métier. De préférence, la source d'azote organique complémentaire est constituée par des extraits protéiques. Ces extraits protéiques ont plus préférentiellement la composition suivante : (en g acides aminés
30 pour 100g de produit) Alanine entre 10 et 4, Aspartique entre 11 et 4, Glycine entre 22 et 2,5 et Lysine entre 7 et 4. Les peptones ou protéines de viande ou de pomme de terre répondent à un tel profil et sont particulièrement préférées pour le procédé selon l'invention, plus particulièrement les dérivés de protéines de pomme de terre.

Par système d'expression de protéines hétérologues approprié, on entend selon l'invention tout système d'expression comprenant des éléments de régulation appropriés pour l'expression de protéines hétérologues dans *E. coli* W. Ces éléments de régulation comprennent notamment les promoteurs, les sites de fixation aux ribosomes, les
5 terminateurs de transcription.

De manière avantageuse, le système d'expression comprend un promoteur *P_{trp}*. Le promoteur *P_{trp}* a été utilisé dans plusieurs exemples (Demande EP 0 198 745 ; Demande CIP N° 08/194,588 ; Demande WO 97/04083 ; Latta *et al.*, 1987, Bio/Technology 5 : 1309-1314 ; Denèfle *et al.*, 1987, Gene 56 : 61-70). En particulier,
10 Latta *et al.* (1990, DNA Cell. Biol. 9 : 129-137) ont conduit une étude détaillée sur l'influence de séquences régulatrices en amont du promoteur, de séquences promotrices dupliquées en tandem et sur l'influence de la coexpression du represseur TrpR. Leur construction de référence, pXL534, a servi de base à la construction de pXL642 (Demande CIP N° 08/194,588) utilisée dans les exemples qui illustrent la présente
15 invention. De manière préférentielle, le promoteur *P_{trp}* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

Selon un mode de réalisation de l'invention, pour améliorer le niveau d'expression de la protéine hétérologue, on effectue une coexpression des chaperons moléculaires d'*E. coli* GroESL (revue par Makrides, 1996, précité). L'augmentation de
20 la concentration intracellulaire des protéines GroESL permet en effet d'assister le repliement de la protéine recombinante et améliore ainsi le taux de protéine active (Weicker *et al.*, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7 : 494-499). Les gènes dont la coexpression favorise l'expression de la protéine hétérologue selon l'invention, et sa qualité , sont compris dans le système d'expression selon l'invention.

Par protéine hétérologue, on entend selon l'invention toute protéine produite par le procédé selon l'invention qui ne se trouve pas naturellement dans *E. coli* W, dans le système d'expression approprié selon l'invention. Il peut s'agir d'une protéine d'origine non bactérienne, par exemple d'origine animale, notamment humaine ou végétale, ou encore d'une protéine d'origine bactérienne non produite naturellement par
30 *E. coli* W, ou encore d'une protéine d'origine bactérienne produite naturellement par une autre bactérie que *E. coli* W ou bien encore d'une protéine produite naturellement par *E. coli* W, dont l'expression est contrôlée par des éléments de régulation distincts de

ceux du système d'expression selon l'invention, ou enfin d'une protéine dérivant des précédentes après modifications de certains éléments de sa structure primaire.

Bien entendu, le procédé selon l'invention s'applique à toute protéine d'intérêt dont la production nécessite une forte accumulation de protéines, avant soit de les extraire et de les purifier, totalement ou en partie, soit de les employer en mélange avec la biomasse qui aura permis de les produire. C'est le cas par exemple d'enzymes utiles pour la biocatalyse de réactions chimiques, qui peuvent être employés sans opération préalable d'isolement et de purification ou aussi d'enzymes qui sont utilisées dans la bactérie hôte en cours de croissance pour la biotransformation de composés chimiques.

De manière avantageuse, la protéine hétérologue est une enzyme, produite en quantités industrielles pour un usage ultérieur comme catalyseur de réactions chimiques. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme est une nitrilase, avantageusement une nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* (ATCC8750) décrite dans la demande de brevet WO 98/18941 ou une nitrilase de *Comamonas testosteroni* sp. décrite dans la demande CIP n°08/194,588, ou une amidase telle que celles décrites dans les demandes WO 97/04083, EP 433 117, EP 488 916, ou encore une hydroxyphenylpyruvate dioxygénase décrite dans la demande WO 96/38567.

La présente invention concerne également une souche *E. coli* W telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur *P_{trp}* défini ci-dessus.

Les exemples ci-dessous permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Les figures 1 à 3 en annexe représentent des cartes de plasmides employés dans les différents exemples.

La figure 1 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT41. Les sites entre parenthèse sont des sites qui ont été éliminés lors des clonages. P_{trp} : promoteur tryptophane ; nitB : gène de la nitrilase ; TrnB : terminateurs de transcription ; fin ROP : fin du gène codant pour la protéine ROP (Chambers et al., 1988, Gene 68 : 139-149) ; ORI : origine de répllication ; RNAI/II : ARN impliqués dans la répllication (Chambers et al., précité); Tc : gène de résistance à la tétracycline.

La figure 2 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT127. Les sites entre parenthèse ont été éliminés lors des clonages. P_{trp} : promoteur tryptophane ; nitB : gène de la nitrilase ; TrnB : terminateurs de transcription; ORI : origine de répllication ;

RNAI*/II : ARN mutés impliqués dans la réplication; Cm : gène de résistance au chloramphenicol ; cer : locus cer .

La figure 3 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT103. Les sites entre parenthèse ont été éliminés lors des clonages. Sm/Sp : gène de résistance à la streptomycine et spectinomycine, parABCDE : locus par (Roberts et Helinski, 1992, J. Bacteriol. 174 : 8119-8132) ; rep, mob, D20 et ori : régions intervenant dans la réplication et le transfert du plasmide (Scholtz et al., 1989, Gene 75 : 271-288 ; Frey et al., 1992, Gene 113 : 101-106).

La figure 4 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT126. Ptrp : promoteur tryptophane ; nitB : gène de la nitrilase ; TrmB : terminateurs de transcription; ORI : origine de réplication ; RNAI*/II : ARN mutés impliqués dans la réplication; Tc^r : gène de résistance à la tétracycline; cer : locus cer .

La figure 5 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT143. Sm/Sp : gène de résistance à la streptomycine et spectinomycine; rep, mob, et ori : régions intervenant dans la réplication et le transfert du plasmide (Scholtz *et al.*, 1989, Gene 75 : 271-288 ; Frey *et al.*, 1992, Gene 113 : 101-106) ; delta se rapporte au nom de la délétion décrite dans le texte.

Les techniques mises en oeuvre sont des techniques classiques de biologie moléculaire et de microbiologie, connues de l'homme de l'art et décrites par exemple par Ausubel *et al.*, 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York), Maniatis *et al.*, 1982, (Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), Coligan *et al.*, 1997 (Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc).

Exemple 1 : Construction des plasmides d'expression pBCAT29 et pBCAT41.

Le fragment de 1.27 kb contenant le promoteur *P_{trp}*, le site de fixation du ribosome du gène *cII* du phage λ (RBS_{cII}) et le gène de la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* ATCC8750 (*nitB*) a été extrait du plasmide pRPA6BCAT6 (Demande FR 96/13077) à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et XbaI pour être cloné dans le vecteur pXL642 (décrit dans la demande CIP N°08/194,588) ouvert par les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT15 a été ouvert par les enzymes StuI et BsmI et le fragment de 4,3 kb a été ligaturé avec le fragment StuI-BsmI

de 136 bp purifié de pRPA-BCAT4 (Demande FR 96/13077) pour conduire au plasmide pRPA-BCAT19. Le séquençage partiel de pRPA-BCAT19 a confirmé le remplacement du codon du résidu Asp279 de la nitrilase par le codon d'un résidu Asn279. Le fragment de 1,2 kb EcoRI-XbaI de pRPA-BCAT19 contenant la fusion
5 *P_{trp} : :RBS_{II} : :nitB* a été ensuite cloné dans le vecteur pRPA-BCAT28 ouvert par les mêmes enzymes pour conduire au plasmide pRPA-BCAT29 de 6,2 kb. Le vecteur pRPA-BCAT28 a été obtenu en ligaturant le fragment de 3,9 kb SspI-ScaI de pXL642 (demande CIP N°08/194,588) avec le fragment de 2,1 kb SmaI de pHP45ΩTc (Fellay *et al.*, 1987, Gene 52 : 147-154) afin de remplacer le marqueur de résistance à
10 l'ampicilline par le marqueur de résistance à la tétracycline. En détruisant le site NdeI proche de l'origine de répllication du plasmide pRPA-BCAT29 par digestion partielle NdeI et action de la Polymérase I d'*E. coli* (Fragment de Klenow), le plasmide pRPA-BCAT41 a été obtenu dont une carte est représentée sur la figure 1. La séquence de la cassette d'expression est représentée par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO
15 2).

Exemple 2 : Expression de la nitrilase d' *A. faecalis* ATCC 8750 chez *E. coli* K12, BL21, W en « batch ».

Les plasmides pRPA-BCAT29 et pXL2035 (Levy-Schill *et al.*, 1995, Gene 161 :
20 15-20) ont été introduits dans les souches d'*E. coli* DH5α (CLONECH, Référence produit C1021-1), BL21 (Novagen, référence produit 69386-1) et W (ATCC9637) par électroporation classique. Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 5 de la demande FR 96/13077 en réduisant le temps de préculture à 8 heures et en fixant le temps d'expression à 16 heures. Les biomasses après expression ont été
25 estimées d'après la densité optique des cultures lue à 660 nm (DO660) en utilisant la relation suivante : biomasse en gramme de poids sec par litre de culture = DO660 x 0,35. Les mesures d'activité nitrilasique des cultures ont été réalisées comme décrit dans la demande FR 96/13077. Pour chaque souche, deux clones ont été analysés et pour chaque clone, l'expérience a été répétée. Le tableau 1 contient pour chaque souche
30 la moyenne des données obtenues dans les quatre expériences.

Tableau 1 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT29 et pXL2035

SOUCHES	BIOMASSE (g/l)	ACTIVITE (U)	PRODUCTIVITE (P)
DH5 α	0,15	10,4	1,6
BL21	0,37	6,3	2,4
W	0,65	7,0	4,5

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

- 5 Ces données montrent que la souche d'*E. coli* W (ATCC9637) est plus performante pour exprimer la nitrilase NitB.

Exemple 3 : Construction de pBCAT43.

Le gène de la polyamide hydrolase de *Comamonas acidovorans* N12 décrit dans la demande WO 97/04083 (*pamII*) a été cloné dans le vecteur pBCAT41. En introduisant dans les amorces de PCR les sites de restriction EcoRI et NcoI en position 5' du gène et XbaI en position 3', le gène de cette polyamide hydrolase a été amplifié par PCR sous la forme d'un fragment d'ADN de 1,26 kb. Ce fragment a ensuite été traité successivement par l'enzyme EcoRI et la nucléase Mung Bean. Après extraction des protéines au phenol-chloroforme-alcool isoamilique, le traitement s'est poursuivi avec une digestion XbaI. De façon similaire, le vecteur pRPA-BCAT41 a été ouvert avec l'enzyme NdeI puis traité à la nucléase Mung Bean. Après extraction des protéines au phenol-chloroforme-alcool isoamilique, le traitement s'est poursuivi avec une digestion XbaI. Après ligature des ces deux échantillons, le plasmide pRPA-BCAT43 a été obtenu : il contient le promoteur *P_{trp}*, le site de fixation RBS_{CI}, séparé du codon d'initiation de la traduction du gène *pamII* par la séquence : AATACTTACACC.

Exemple 4 : Expression de la polyamidase PamII chez *E. coli* DH5 α , BL21 et W en « batch ».

Le plasmide pRPA-BCAT43 a été introduit dans les souches d'*E. coli* DH5 α , BL21 et W par électroporation classique. Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 2 ci-dessus et en variant le temps d'expression de 14 à 24

heures. Les biomasses après expression ont été estimées comme dans l'exemple 2 ci-dessus. Les mesures d'activité polyamide hydrolase des cultures ont été réalisées comme décrit dans la demande WO 97/04083 avec les modifications suivantes :

- les cellules ont été perméabilisées avec du toluène en resuspendant les culots
5 cellulaire dans un tampon 100mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH8, toluène 1% de façon à avoir une concentration en cellules sèches d'environ 5 g/l ; après une vigoureuse agitation, la suspension est incubée une heure à 4°C puis centrifugée et enfin les culots de cellules perméabilisées sont repris dans un tampon phosphate 100 mM , pH7.
- l'activité d'hydrolyse a été mesurée sur l'oligomère AB (une molécule d'acide
10 adipique condensée à une molécule d'hexaméthylène diamine) présent à 2,5 g/l dans le milieu réactionnel contenant du tampon-phosphate de potassium 0,1 M à pH7 et incubé à 30°C sous agitation ;
- des prélèvements de 100 microlitres sont faits à intervalles réguliers en leur ajoutant le même volume de NaOH 0,2 N ;
- 15 - les échantillons sont analysés par HPLC après dilution au dixième dans une solution d'H₃PO₄ à 50 mM.

Pour chaque souche, de 1 à 24 clones ont été analysés et pour chaque clone, une à sept expériences indépendantes ont été conduites. Le tableau 2 contient pour chaque souche la moyenne des données obtenues.

20

Tableau 2 : Biomasse et activités des souches hébergeant le plasmide pRPA-BCAT43

SOUCHES	NB CULTURES	ACTIVITE (U)	PRODUCTIVITE (P)
DH5a	11	0,77	0,3
BL21	3	1,4	1,8
W	24	2,1	2,6

ABREVIATIONS : NB : nombre ; U : g d'AB hydrolysé par heure et par g de poids sec ; P : g d'AB hydrolysé par heure et par litre de culture

25

Ces données montrent que la souche d'*E. coli* W (ATCC9637) est plus performante pour exprimer la polyamidase PamII.

Exemple 5 : Construction et caractérisation du plasmide pBCAT41-531.

Le plasmide pRPA-BCAT41 a subi une étape de mutagenèse réalisée avec de l'hydroxylamine comme décrit dans Miller 1992 (Mutagenesis. A short course in bacterial genetics, « A laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria », Cold Spring Harbour Laboratory Press, Unit 4, pp81-212) et Humphreys *et al.*, 1976 (Mol. Gen. Genet. 145 : 101-108). Cinq microgrammes d'ADN plasmidique purifié sur gradient de chlorure de Césium ont été incubés 20 minutes à 80°C dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH6 contenant 0,5 mM EDTA et 0,4 M NH₂OH.

Après ajout d'un volume identique de tampon phosphate de sodium 50 mM pH6 contenant 0,5 mM EDTA, le mélange réactionnel a été dialysé contre un large excès de tampon Tris-HCl 10 mM pH7,5 contenant 1 mM EDTA et 100 mM NaCl. L'ADN plasmidique a ensuite été récupéré par précipitation et environ 20 ng d'ADN a été introduit par électroporation dans la souche DH5α hébergeant le plasmide pXL2035.

Parmi les transformants obtenus, un clone a été sélectionné à cause d'une productivité de la culture 3 fois supérieure à celle d'une culture de la souche DH5α (pRPA-BCAT41, pXL2035). Le plasmide pRPA-BCAT41-531 qu'il hébergeait a été extrait et réintroduit dans un nouvel hôte DH5α hébergeant le plasmide pXL2035. Trois clones ont alors été analysés dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en les comparant à 3 clones DH5α (pRPA-BCAT41, pXL2035) et les résultats sont présentés dans le tableau dans le tableau 3.

Tableau 3 : *Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT41-531 et pXL2035*

Souches	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
DH5α (pRPA-BCAT41, pXL2035)	0,21	12	2,5
DH5α (pRPA-BCAT41-531, pXL2035).	0,63	12	7,5

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture.

Ces résultats indiquent que l'amélioration de la productivité des cultures est
5 corrélée à la présence du plasmide pRPA-BCAT41-531.

Le fragment de 1,27 kb EcoRI-XbaI contenant la fusion $P_{trp} : nitB$ a été extrait du plasmide pRPA-BCAT41 pour être cloné à la place de celui contenu dans pRPA-BCAT41-531. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT86 a été introduit dans la souche DH5a (pXL2035) et 3 transformants ont été étudiés dans des conditions similaires à
10 celles décrites ci-dessus. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT86 et pXL2035

Souches	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
DH5α (pRPA-BCAT41, pXL2035)	0,20	13,8	2,7
DH5α (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)	0,68	11,0	7,4
DH5α (pRPA-BCAT86, pXL2035)	0,69	11,9	8,1

15 ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

Les résultats montrent que l'amélioration de la productivité des cultures hébergeant pRPA-BCAT41-531 n'est pas due à une amélioration de l'activité spécifique
20 de la souche et que cette amélioration n'est pas causée par une mutation dans le fragment portant le promoteur P_{trp} et le gène $nitB$.

**Exemple 6 : Caractérisation d'une mutation portée par le plasmide pBCAT41-531 responsable de l'amélioration de la productivité des cultures de
25 souches exprimant la nitrilase.**

L'analyse de la quantité de protéine produite par les souches de l'exemple 5 par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS a montré que toutes ces constructions conduisaient à des taux de synthèse de polypeptide nitrilasique comparables entre les souches décrites dans cet exemple. En revanche, des préparations d'ADN plasmidique de pRPA-BCAT41 et pRPA-BCAT41-531 réalisées à partir de quantités de biomasse équivalentes ont mis en évidence que le plasmide pRPA-BCAT41-531 est présent à plus faible nombre de copie que son parent pRPA-BCAT41. Le séquençage de la région de 994 bp de pRPA-BCAT41-531 qui s'étend depuis le site Tth1111 et qui couvre l'origine de réplication du plasmide a mis en évidence deux différences par rapport à la séquence de la région correspondante de pBR322 (GeneBank #J01749, nom : SYNpBR322). En se référant à la numérotation donnée dans la séquence J01749 (0 est le milieu de l'unique site EcoRI), nous avons trouvé qu'une insertion d'un A avait eu lieu après la base 2319 et que le C de la position 3039 est remplacé par un T chez pRPA-BCAT41-531. La première différence est imputable à une erreur lors de l'action de la polymérase Klenow qui a servi à détruire un des sites NdeI de pRPA-BCAT29 et se situe dans une région qui n'est pas décrite comme jouant un rôle dans la réplication de pBR322 (Chambers *et al.*, 1988, Gene 68 : 139-149). La deuxième erreur correspond à une transition, effet caractéristique de l'hydroxylamine sur l'ADN (Drake et Baltz, 1976, Annu. Rev. Biochem. 45 : 11-37), et se situe au niveau du deuxième nucléotide de la région transcrite en ARN I impliquée dans la réplication de pBR322 (Chambers *et al.*, précité). C'est cette dernière mutation qui est responsable du plus faible nombre de copies de pRPA-BCAT41-531 dans DH5 α et qui est responsable de la meilleure productivité nitrilasique des cultures de la souche DH5 α (pRPA-BCAT41-531, pXL2035).

25

Exemple 7 : Expression de la nitrilase de *A. faecalis* ATCC 8750 chez *E. coli* BL21 et *E. coli* W en « fed-batch » (culture semi-continue).

Les plasmides pRPA-BCAT41-531 et pXL2035 ont été introduits par électroporation dans les souches BL21 (référence précitée) et W (ATCC9637) pour donner respectivement les souches RPA-BIOCAT594 [BL21 (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)] et RPA-BIOCAT714 [W (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)]. Les recombinants *E. coli* BIOCAT 594 et *E. coli* BIOCAT 714 ont été cultivés dans des

30

fermenteurs de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

Composé	Concentration en g/ l
KH_2PO_4	8
K_2HPO_4	6,3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,75
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5
Sulfate de fer	0,04
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05
Sulfate de manganèse	0,01
Chlorure de Co	0,004
Sulfate de Zn	0,002
Molybdate de Na	0,002
Chlorure de cuivre	0,002
Acide borique	0,0005
Citrique. H_2O	1,7
Glucose monohydraté	95
L-tryptophane	0,1
Peptone de viande	5
Extrait de levure	3

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. Le glucose est introduit au début à une concentration finale de 2 g/ l. Après être totalement consommé, il est introduit de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : glucose 700 g/ l ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 19,6 g/ l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose/h. l de milieu.

Après 24 heures de fermentation, le milieu est récupéré, centrifugé et le poids sec est estimé en g/ l. L'activité enzymatique est mesurée suivant un protocole donné dans le brevet WO96/09403. Elle est exprimée en kilos de 3-hydroxybutanoate d'ammonium formées par heure et par kilo de cellules sèches.

Souche	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur glucose
BIOCAT 594 (BL21)	27 g/l	13	23%
BIOCAT 714 (W)	40 g/l	17	40%

Il apparaît clairement dans cet exemple, que la nitrilase s'exprime beaucoup mieux dans *E. coli* W que dans *E. coli* BL21 et que le recombinant *E. coli* W BIOCAT 714 pousse beaucoup mieux que le recombinant *E. coli* BL21 BIOCAT 594.

5

Exemple 8 : Influence de la source d'azote organique d'origine animale.

La souche E. coli W BIOCAT 714 est cultivée dans un fermenteur de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

5

Composé	Concentration dans le milieu en g/ l
K_2HPO_4	8
$(NH_4)_2SO_4$	0,75
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,5
Sulfate de fer	0,04
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,04
Sulfate de manganèse	0,026
Chlorure de Co	0,004
Sulfate de Zn	0,013
Molybdate de Na	0,001
Chlorure de cuivre	0,001
Acide borique	0,00025
$AlCl_3$	0,00125
Citrique. H_2O	1,7
Glucose monohydraté	95
L-tryptophane	0,1
Extrait de levure	3

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. Le glucose est introduit au début à une concentration finale de 2 g/ l. Après
 10 être totalement consommé, il est introduit de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : glucose 700 g/ l ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 19,6 g/ l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose/h. l de milieu.

A ce milieu, on ajoute une source d'azote organique d'origine animale.

Source d'azote organique d'origine animale	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur glucose
Aucune	30	2	40%
2,5 g/ l de peptone de viande	33	12	40%
5 g/ l de peptone de viande	40	25	45%
5 g/ l de caséine	35	20	43%

L'utilisation de concentration croissante en azote organique d'origine animale augmente de manière significative l'activité spécifique des cellules.

5

Exemple 9 : Influence de l'azote organique d'origine végétale.

Les conditions de culture sont identiques à celles de l'exemple 8. Dans cet exemple, on ajoute de l'azote organique d'origine végétal.

Source d'azote organique d'origine végétale	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur glucose
Aucune	30	2	40%
5 g/ l de peptone de soja	31	4	40%
5 g/ l de peptone de blé	32	5	40%
7,5 g/ l d'hydrolysate sodique de protéine de pomme de terre (Alburex SP ; Roquette)	35	17	43%

10

L'ajout d'azote organique végétal ne donne pas des résultats identiques suivant l'origine.

De manière surprenante, l'ajout de protéine de pomme de terre, donne d'aussi bon résultat que l'azote organique d'origine animale.

15

Exemple 10 : influence de la source de carbone.

La souche E. coli W BIOCAT 714 est cultivée dans un fermenteur de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

Composé	Concentration dans le milieu en g/ l
Trempe de Maïs LAB2218 (Roquette)	40
Extrait de levure	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. La source de carbone est introduite au début à une concentration finale de 2 g/ l. Après être totalement consommée, elle est introduite de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : source de carbone 700 g/ l ; MgSO₄·7H₂O 19,6 g/ l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose ou de saccharose/h. l de milieu.

La source de carbone est variée dans cet exemple.

Source de carbone	Biomasse finale	Activité finale	Rendement sur carbone
Glucose monohydraté 90 g/ l	38	11	45%
Sirop zéro (EUROSUCRE) 90 g/ l	38	17	45%

Dans cet exemple, on observe que l'emploi de saccharose (sirop zéro) comme source de carbone augmente de manière significative l'activité spécifique des cellules.

Exemple 11 : Construction d'un plasmide de co-expression du régulateur TrpR

Un fragment d'ADN de 434 bp porteur du gène *trpR* et de son promoteur a été extrait du plasmide pRPG9 (Gunsalus et Yanofsky, 1980, Proc. Natl. Aca. Sci. USA 77 : 7117-7121) à l'aide des enzymes de restriction AatII et StuI. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pSL301 (Brosius, 1989, DNA 8 : 759-777) en le ligaturant au fragment d'environ 3,1 kb AatII-StuI pour donner le plasmide pRPA-BCAT30. Le gène *trpR* et son promoteur ont alors été extraits de pRPA-BCAT30 sous la forme d'un fragment d'EcoRI-NotI de 475 bp pour être cloné dans le plasmide pXL2035 à la place

d'un fragment de 240 bp EcoRI-NotI. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT34, est donc un dérivé de pKT230 permettant l'expression des chaperons GroESL et du régulateur TrpR.

Exemple 12 : Influence de la co-expression de GroESL et de TrpR .

Le plasmide pRPA-BCAT34 a été introduit par électroporation dans les souche DH5 α (pRPA-BCAT29), BL21 (pRPA-BCAT29) et W (pRPA-BCAT29). Des cultures d'expression de différentes souches ont été menées comme décrit dans l'exemple 2 et les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Biomasse et activités des souches hébergeant des combinaisons les plasmides pRPA-BCAT29, pXL2035 et pRPA-BCAT34

Combinaisons	pRPA-BCAT29		pRPA-BCAT29 pXL2035		pRPA-BCAT29 pRPA-BCAT34	
	U	P	U	P	U	P
DH5alpha	0,37	0,16	10,4	1,6	2,0	0,7
BL21	0	0,0	6,4	2,4	5,6	2,0
W	1,7	0,96	7,0	4,5	8,9	6,5

ABREVIATIONS : U : Activité, kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids

sec ; P : Productivité, kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

Les résultats montrent que la coexpression de GroESL permet d'augmenter la productivité des cultures quelle que soit la souche considérée en améliorant l'activité spécifique des cultures. Cet effet est corrélé avec une augmentation de la solubilité du polypeptide nitrilasique comme le montre une analyse des protéines par électrophorèse telle que décrite dans la demande FR 96/13077. L'effet de la coexpression du régulateur TrpR est variable selon les souches mais permet chez W d'améliorer la productivité des cultures.

Exemple 13 : Influence de la présence d'un locus *cer* sur pRPA-BCAT41

Le fragment de 382 bp HpaII contenant le locus *cer* du plasmide ColE1 (Leung *et al.*, 1985, DNA 4 : 351-355) a été cloné dans la forme replicative du phage M13mp7 au niveau d'un des 2 sites AccI. La construction obtenue a alors permis d'extraire avec
 5 l'enzyme EcoRI un fragment d'environ 430 bp contenant le locus *cer* qui a été cloné dans pRPA-BCAT41 au site EcoRI, ce qui a conduit au plasmide pRPA-BCAT66. Ce plasmide a été introduit par électroporation dans la souche W hébergeant le plasmide pRPA-BCAT34. Des cultures d'expression de différentes souches ont été menées
 10 comme décrit dans l'exemple 2 en allongeant la durée des cultures d'expression à 24 heures et en étudiant trois clones de chaque souche dans une unique expérience. Les résultats moyennés sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT66 et pRPA-BCAT34

15

Souches	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
W (pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT 34)	2,1	6,9	14,5
DH5α (pRPA-BCAT66, pRPA-BCAT34)	1,8	10,0	18,0

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par

20 Ces résultats montrent que l'ajout du locus *cer* sur le plasmide d'expression de la nitrilase conduit à améliorer la productivité des cultures.

Exemple 14 : Construction du plasmide pRPA-BCAT127

Après élimination du site unique NdeI du plasmide pRPA-BCAT30 par digestion et formation d'extrémités franches avec de la polymérase I (Fragment de
 25 Klenow), le gène *trpR* a été extrait de ce dernier plasmide sous la forme d'un fragment d'environ 300 bp préparé par un traitement avec l'enzyme AatII suivi de l'action de la polymérase I (Fragment de Klenow), puis, après inactivation du mélange réactionnel,

par une digestion avec l'enzyme SacII. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pRPA-BCAT66 après ouverture de celui-ci avec Tth111 suivi d'un traitement à la polymérase I (Fragment de Klenow) et, après inactivation, avec SacII. Le plasmide pRPA-BCAT82 a ainsi été obtenu. Son origine de répllication a été remplacée par celle du plasmide pRPA-BCAT41-531 en remplaçant le fragment Bst1107I-Eam1105I d'environ 1,12 kb. La construction sélectionnée lors de ce clonage, le plasmide pRPA-BCAT99, présente un artefact qui se manifeste sous la forme d'une délétion d'un nucléotide au niveau du site Eam1105I, transformant ce site en un site unique PshAI. Le marqueur de résistance du plasmide pRPA-BCAT99 a alors été changé en clonant entre les sites AatII et PshAI un fragment AatII-PshAI d'environ 1,07 kb préparé après amplification PCR du gène codant pour la résistance au chloramphenicol à partir de la matrice pACYC184 (New England Biolabs #401-M) en utilisant les amorces Cm1 et Cm2 dont la séquence est :

Cm1 : 5'-CCCCCGACAGCTGTCTTGCTTTCGAATTTCTGCC

15 Cm2 : 5'-TTGACGTCAGTAGCTGAACAGGAGGG

Le plasmide ainsi obtenu a été appelé pRPA-BCAT123. Il a été ensuite modifié en éliminant le gène *trpR* sous la forme d'un fragment SacI-Bst1107I d'environ 0,525 kb, et refermeture du plasmide après formation d'extrémités franches avec de la polymérase Pfu (15 minutes à 75°C dans le tampon recommandé par le fournisseur Stratagène et en présence de 0,2 mM de deoxynucléotides). Le plasmide ainsi obtenu est le plasmide pRPA-BCAT127 dont la carte est schématisée sur la figure 2.

Exemple 15 : Construction des plasmides pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT103 .

25 Le plasmide pRPA-BCAT37, décrit dans la demande FR 96/13077, a été modifié en remplaçant le fragment SfiI-ScaI d'environ 3,2 kb par le fragment SfiI-ScaI d'environ 2,42 kb du plasmide RSF1010D20 (Frey *et al.*, 1992, Gene 113 :101-106). Ce fragment contient une délétion dans la partie 5' du gène codant pour la primase RepB et réduit de 6 log la fréquence de transfert du plasmide (Frey *et al.*, précité). Le plasmide ainsi obtenu, pRPA-BCAT98, possède plusieurs avantages : la perte de ses fonctions de mobilisation le rend conforme aux règles de biosécurité industrielle tout en lui gardant ses caractéristiques de répllication chez les bactéries Gram-négatives.

30

Le locus *par* (Gerlitz *et al.*, 1990, J. Bacteriol 172 : 6194-6203) a ensuite été cloné sur pRPA-BCAT98 comme suit. Le fragment SphI-BamHI d'environ 2,3 kb de pGMA28 (Gerlitz *et al.*, précité) a d'abord été cloné dans le vecteur pUC18, ce qui a permis de l'extraire sous la forme d'un fragment HindIII-EcoRI pour le cloner dans le vecteur pMTL22 (Chambers *et al.*, 1988, Gene 68:139-49). Le site HindIII a ensuite été détruit par digestion HindIII et traitement à la Klenow. Un fragment d'environ 2,38 kb a alors été extrait avec les enzymes PstI et BglII pour être cloné dans le vecteur pXL2426 aux sites PstI et BamHI et conduire au vecteur pXL2572. Le vecteur pXL2426 provient du remplacement du fragment de 2,38 kb SfiI-EcoRV de pXL2391 (demande FR 96/13077) par le fragment SfiI-EcoRV de 1,47 kb de RSF1010D20. Le clonage sur le plasmide pXL2572 aux sites NdeI et BamHI d'un fragment d'environ 0,960 bp NdeI-BamHI de pRR71 (Weinstein *et al.*, 1992, J. Bacteriol. 174 : 7486-7489) a permis de reconstituer le locus *par* en entier sur le plasmide pXL2573. Ce locus a alors été extrait de pXL2573 sous la forme d'un fragment de 2,6 kb EcoRI-extremité franche (après traitement par PstI et Klenow) afin d'être cloné sur le plasmide pRPA-BCAT98 ouvert par EcoRI et SacI, cette dernière extrémité ayant été traitée par la polymérase Pfu. Le plasmide résultant a été appelé pRPA-BCAT103 et sa carte est schématisée sur la figure 3.

Exemple 16 : Utilisation des plasmides pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103 et pRPA-BCAT127 pour l'expression de la nitrilase chez W.

Les plasmides pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103, pXL2035 et pXL2231 (demande FR 96/13077) ont été introduits dans la souche d'*E. coli* W par électroporation et des cultures d'expression ont été menées dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en utilisant les antibiotiques suivants : Tétracycline 12 µg/ml pour pXL2231, kanamycine 50 µg/ml pour pXL2035, Streptomycine 100 µg/ml pour pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT103, Chloramphenicol 20 µg/ml pour pRPA-BCAT127. Pour chaque combinaison de plasmides, deux à trois clones ont été analysés et les résultats moyens sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103, pXL2035 et pXL2231

Combinaison	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
pBCAT127 / pXL2231	1,43	4,9	7
pBCAT127 / pBCAT 103	1,75	7	12
pBCAT127 / pBCAT98	1,72	11,2	19
pBCAT127 / pXL2035	1,70	7,2	12
pBCAT41-531 / pXL2035	1,36	5,9	8

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

10 Les combinaisons pRPA-BCAT127/pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT127/pRPA-BCAT103 permettent une productivité au moins équivalente en utilisant des plasmides conformes aux critères de biosécurité européens.

Exemple 17 : Construction du plasmide pRPA-BCAT126

15 Le marqueur de résistance du plasmide pRPA-BCAT99 décrit dans l'exemple 14 a été changé comme suit. Le vecteur a été ouvert par les enzymes PshAI et AatII puis traité avec de la polymérase Pfu (5 min à 75°C dans le tampon recommandé par le fournisseur Stratagene et en présence de 0,2 mM de deoxynucléotides) et le fragment d'environ 3,95 kb a été extrait d'un gel d'agarose à l'aide du kit Quiaex (Quiagen) [d'autres systèmes de récupération d'ADN peuvent aussi être utilisés, notamment ceux
20 de type chromatographique]. Il a été mis en ligation selon une méthode classique avec le fragment de 1,32 kb HindIII-BsmI extrait du plasmide pBR322 (New England Biolabs, ref 303-3S) puis traité comme ci-dessus avec la polymérase Pfu. Parmi les plasmides obtenus, le plasmide contenant l'insert porteur du gène de résistance à la tétracycline orienté dans le même sens de transcription que la cassette d'expression de la

nitrilase a été nommé pRPA-BCAT111. Ce plasmide a alors été ouvert par les enzymes NsiI et BstZ17I puis traité à la polymérase Pfu et reliqué afin d'éliminer le fragment de 0,47 kb porteur du gène *trpR*. Le plasmide obtenu a été nommé pRPA-BCAT126 dont une carte est représentée sur la figure 4.

5

Exemple 18 : Construction du plasmide pRPA-BCAT143

Le plasmide pRPA-BCAT98 décrit dans l'exemple 15 a été ouvert par les enzymes SfiI et ScaI pour remplacer le fragment de 2,42 kb porteur de la délétion dans la partie 5' du gène codant pour la primase RepB par le fragment de 2,96 kb SfiI-ScaI
10 extrait du plasmide RSF1010Δ18 portant une délétion en phase de 267 bp dans la partie 5' du gène *repB* (Frey *et al.*, 1992, Gene 113 : 101-106). La délétion introduite sur pRPA-BCAT143 réduit la fréquence de transfert du plasmide à 10^{-6} (Frey *et al.*, 1992, Gene 113 : 101-106) et le rend conforme aux exigences des règles de biosécurité. Contrairement au plasmide pRPA6BCAT98 décrit précédemment, ce nouveau plasmide
15 conserve un nombre de copies voisin du plasmide non modifié pXL2035 (Lévy-Schill *et al.*, 1995, Gene 161 : 15-20). IL est représenté sur la figure 2.

Exemple 19 : Utilisation des plasmides pRPA-BCAT126 et pRPA-BCAT143 pour l'expression de la nitrilase chez W

20 Les plasmides pRPA-BCAT126, pRPA-BCAT127 (décrits ci-dessus), pRPA-BCAT143, pRPA-BCAT98, pXL2035 ont été introduits dans la souche d'*E. coli* W par électroporation et des cultures d'expression ont été menées dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en utilisant les antibiotiques suivants : Tétracycline 12 µg/ml pour pRPA-BCAT41-531 et pRPA-BCAT126, kanamycine 50 µg/ml pour pXL2035,
25 Streptomycine 100 µg/ml pour pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT143, Chloramphenicol 20 µg/ml pour pRPA-BCAT127. Pour chaque combinaison de plasmides, deux à trois clones ont été analysés et les résultats moyens sont présentés dans le tableau 8.

30

Tableau 8 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT126, pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT143, pXL2035.

Combinaison	Biomasse (g/l)	Activité (U)	Productivité (P)
pBCAT41-531 / pXL2035	2,3	9,5	22
pBCAT41-531 / pBCAT143	2,5	8,9	22
pBCAT126 / pXL2035	2,2	9,8	21
pBCAT126 / pBCAT98	1,3	3,5	4,5
pBCAT126 / pBCAT 143	2,5	8,1	20
pBCAT127 / pBCAT143	2,8	7,1	20

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

5

Contrairement au plasmide pBCAT98, les combinaisons du plasmide pRPA-BCAT143 avec l'un des plasmides pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT127 ou pRPA-BCAT126 permettent de conserver la productivité des cultures réalisées avec les

10 souches hébergeant le plasmide pXL2035.

REVENDICATIONS

1. Procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans *E coli*, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries *E coli* modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de *E. coli* est une souche *E. coli* W.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche W est la souche W déposée à l'ATCC sous le numéro 9637.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche W est un dérivé de la souche déposée à l'ATCC sous le numéro 9637 obtenu par sélection clonale ou manipulation génétique.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le milieu de culture approprié est un milieu de culture approprié pour l'obtention d'une forte densité de biomasse et une forte teneur en protéines hétérologues produites.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend du L-tryptophane.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la quantité de L-tryptophane dans le milieu de culture est comprise entre 0,05 et 0,5 g/l, de préférence entre 0,1 et 0,3 g/l.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend du saccharose comme principale source de carbone.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le milieu de culture ne comprend substantiellement que du saccharose comme source de carbone.
9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la quantité de saccharose dans le milieu de culture est comprise entre 0,1 et 300 g/l en début de culture, de préférence entre 0,5 et 200 g/l.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le milieu de culture approprié comprend en outre une source d'azote organique complémentaire.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la source d'azote organique complémentaire est constituée par des extraits protéiques.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que l'extrait protéique a la composition suivante : (en g acides aminés pour 100g de produit) Alanine entre 10 et 4, Aspartique entre 11 et 4, Glycine entre 22 et 2,5 et Lysine entre 7 et 4
- 5 13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que la source d'azote organique complémentaire est constituée par les peptones ou protéines de viande ou de pomme de terre, plus particulièrement les dérivés de protéines de pomme de terre.
- 10 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le système d'expression de protéines hétérologues approprié comprend un promoteur *P_{trp}*.
- 15 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le promoteur *P_{trp}* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).
16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que la protéine hétérologue est une enzyme.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'enzyme est utile pour la biocatalyse de réactions chimiques.
18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'enzyme est une nitrilase.
- 20 19. Souche *E. coli* W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur *P_{trp}*.
- 25 20. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que le promoteur *P_{trp}* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

1/4

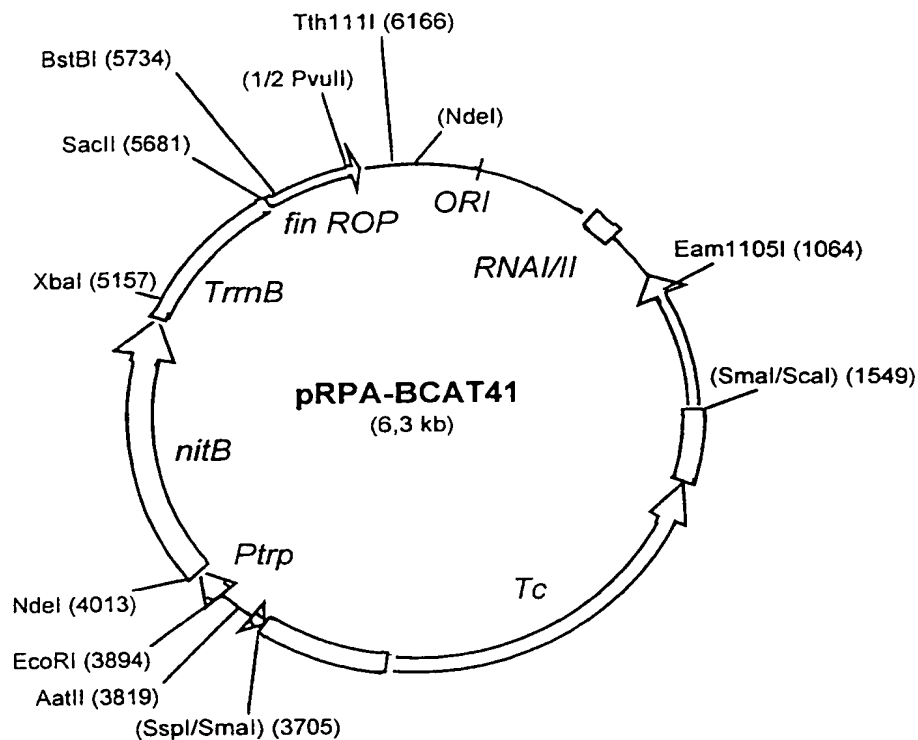


Fig. 1

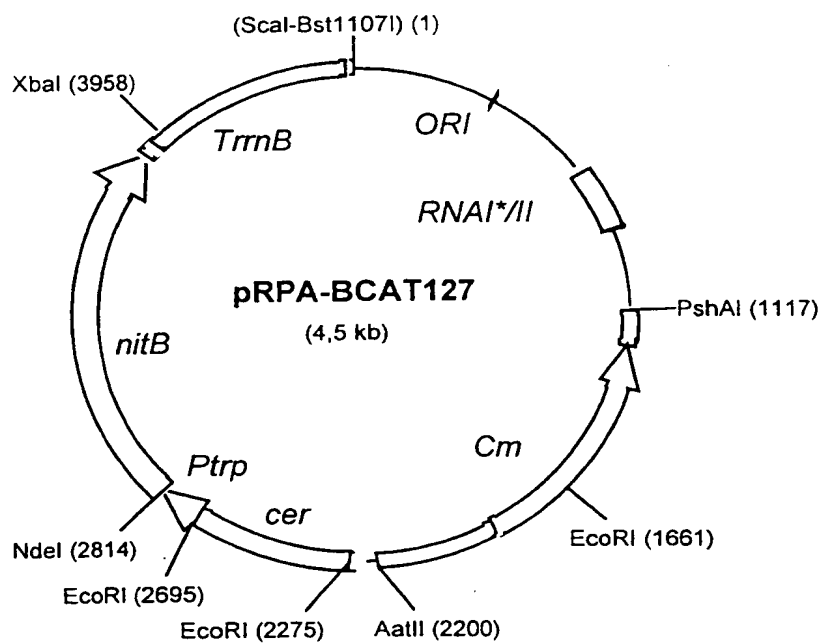


Fig. 2

2/4

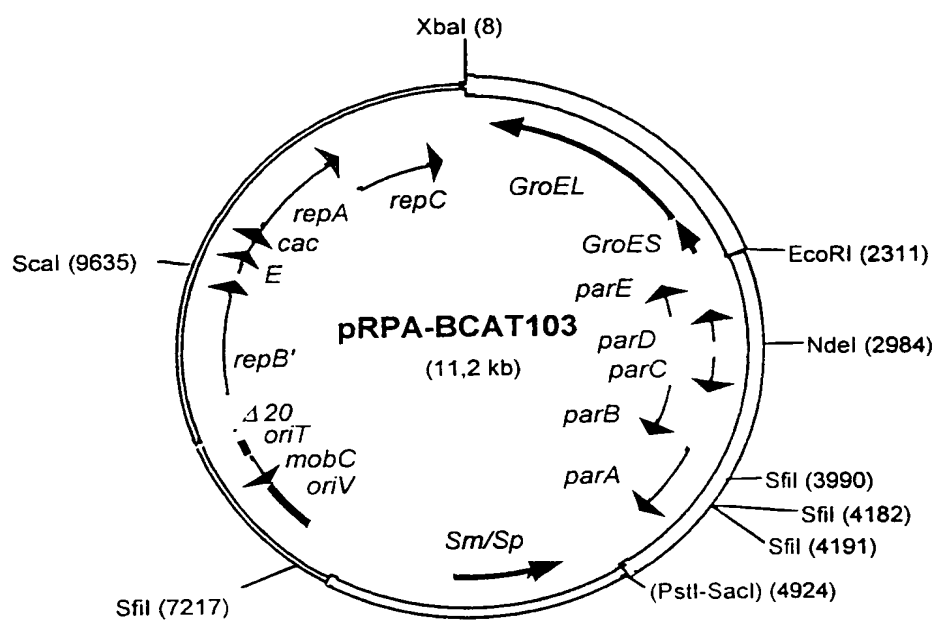


Fig. 3

3/4

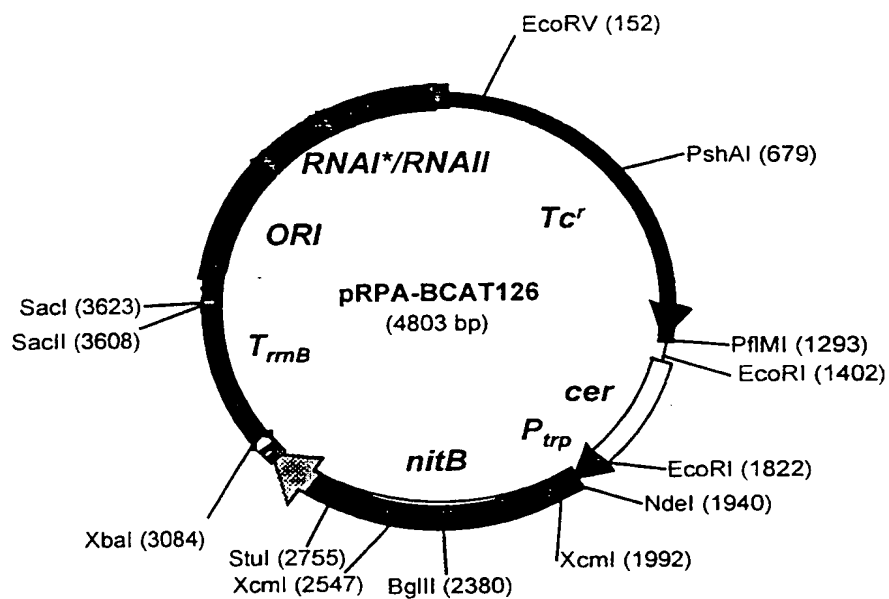


Fig 4

4/4

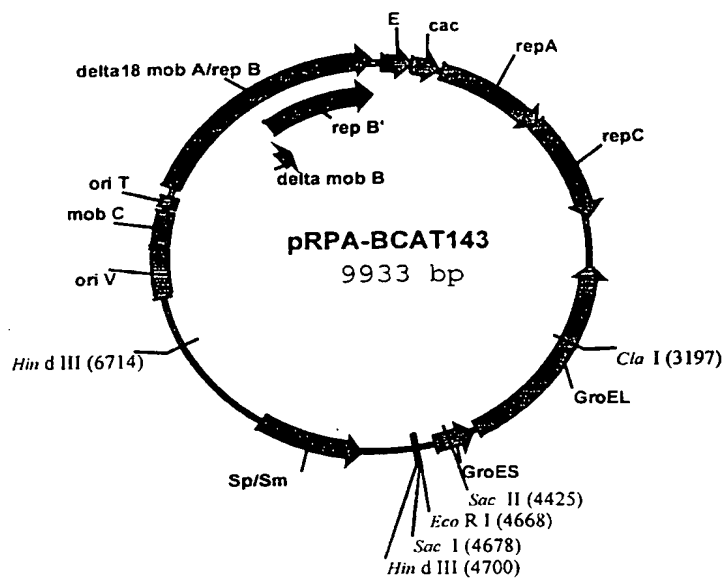


Fig 5

LISTE DE SEQUENCES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 121 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```
GAATTCCCTG TTGACAATTA ATCATCGAAC TAGTTAACTA GTACGCAGCT TGGCTGCAGG      60
TCGACCTGCA GCCAAGCTTG GGCATACATT CAATCAATTG TTATCTAAGG AAATACTTAC      120
A                                                                              121
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1793 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 123..1190

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```
GAATTCCCTG TTGACAATTA ATCATCGAAC TAGTTAACTA GTACGCAGCT TGGCTGCAGG      60
TCGACCTGCA GCCAAGCTTG GGCATACATT CAATCAATTG TTATCTAAGG AAATACTTAC      120
AT ATG CAG ACA AGA AAA ATC GTC CGG GCA GCC GCC GTA CAG GCC GCC      167
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala
  1           5           10           15
TCT CCC AAC TAC GAT CTG GCA ACG GGT GTT GAT AAA ACC ATT GAG CTG      215
Ser Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu
           20           25           30
GCT CGT CAG GCC CGC GAT GAG GGC TGT GAC CTG ATC GTG TTT GGT GAA      263
Ala Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu
           35           40           45
ACC TGG CTG CCC GGC TAT CCC TTC CAC GTC TGG CTG GGC GCA CCG GCC      311
Thr Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala
  50           55           60
```


TGG TCG CTG AAA TAC AGT GCC CGC TAC TAT GCC AAC TCG CTC TCG CTG	359
Trp Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu	
65 70 75	
GAC AGT GCA GAG TTT CAA CGC ATT GCC CAG GCC GCA CGG ACC TTG GGT	407
Asp Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly	
80 85 90 95	
ATT TTC ATC GCA CTG GGT TAT AGC GAG CGC AGC GGC GGC AGC CTT TAC	455
Ile Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr	
100 105 110	
CTG GGC CAA TGC CTG ATC GAC GAC AAG GGC CAG ATG CTG TGG TCG CGT	503
Leu Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Gln Met Leu Trp Ser Arg	
115 120 125	
CGC AAA CTC AAA CCT ACA CAT GTT GAG CGC ACC GTG TTT GGT GAA GGT	551
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly	
130 135 140	
TAT GCC CGA GAT CTG ATT GTG TCC GAC ACC GAG CTG GGC CGC GTC GGT	599
Tyr Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly	
145 150 155	
GCC CTG TGC TGC TGG GAG CAC CTG TCC CCC TTG AGC AAG TAC GCG CTG	647
Ala Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu	
160 165 170 175	
TAC TCC CAG CAC GAA GCC ATT CAC ATT GCC GCC TGG CCG TCC TTT TCG	695
Tyr Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser	
180 185 190	
CTG TAC AGC GAA CAG GCC CAT GCG CTC AGC GCC AAG GTG AAC ATG GCT	743
Leu Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala	
195 200 205	
GCC TCG CAA ATC TAT TCG GTT GAA GGC CAG TGC TTT ACC ATC GCC GCC	791
Ala Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala	
210 215 220	
AGC AGT GTC GTC ACC CAG GAG ACA CTG GAC ATG CTG GAA GTA GGT GAA	839
Ser Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu	
225 230 235	
CAC AAC GCC TCC CTG CTG AAA GTG GGC GGC GGC AGT TCC ATG ATT TTT	887
His Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe	
240 245 250 255	
GCG CCG GAC GGA CGC ACA TTG GCT CCC TAC CTG CCA CAC GAT GCC GAA	935
Ala Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu	
260 265 270	
GGC CTG ATC ATT GCC GAT CTG AAC ATG GAA GAA ATT GCC TTC GCC AAG	983
Gly Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys	
275 280 285	
GCG ATC AAC GAC CCT GTG GGC CAC TAC TCC AAA CCC GAG GCC ACC CGT	1031
Ala Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg	
290 295 300	

CTG GTA CTG GAC CTG GGG CAC CGT GAG CCC ATG ACT CGG GTG CAT TCC	1079
Leu Val Leu Asp Leu Gly His Arg Glu Pro Met Thr Arg Val His Ser	
305 310 315	
AAA AGC GTG ATC CAG GAA GAA GCT CCC GAG CCG CAC GTG CAA AGT ACG	1127
Lys Ser Val Ile Gln Glu Glu Ala Pro Glu Pro His Val Gln Ser Thr	
320 325 330 335	
GCT GCG CCC GTC GCC GTC AGC CAG ACT CAG GAC TCG GAT ACG CTA CTG	1175
Ala Ala Pro Val Ala Val Ser Gln Thr Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu	
340 345 350	
GTG CAA GAA CCG TCC TGA CCCCCAAAAGA TGACAAGGCC CGGGCAAAC	1223
Val Gln Glu Pro Ser	
355	
GTCCGGGTCT TGATTCTTC TCGTCCCGG ATCCACTAGT TCTAGAGTCG ACCTGCAGGC	1283
ATGCAAGCTT GGGTCCCACC TGACCCCATG CCGAACTCAG AAGTGAAACG CCGTAGCGCC	1343
GATGGTAGTG TGGGGTCTCC CCATGCGAGA GTAGGGAAC	1403
GCCAGGCATC AAATAAAACG	
AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTTCG TTTTATCTGT TGTTTGTCGG TGAACGCTCT	1463
CCTGAGTAGG ACAAATCCGC CGGGAGCGGA TTTGAACGTT GCGAAGCAAC GGCCCGGAGG	1523
GTGGCGGGCA GGACGCCCGC CATAAACTGC CAGGCATCAA ATTAAGCAGA AGGCCATCCT	1583
GACGGATGGC CTTTTTGCGT TTCTACAAAC TCTTCCTGTC GTCATATCTA CAAGCCATCC	1643
CCCCACAGAT ACGGTAACT AGCCTCGTTT TTGCATCAGG AAAGCAGCTA TGAACCACTC	1703
CTTAAACCC TGAACACAT TTGGCATTGA TCATAATGCT CAGCACATTG TATGTGCCGA	1763
AGACGAACAA CAATTACTCA ATGCCCCGGG	1793

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: oligonucléotide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCCCCGACA GCTGTCTTGC TTTCGAATTT CTGCC

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: oligonucléotide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTGACGTCAG TAGCTGAACA GGAGGG

26

TRAITEMENT DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PH-98/032

(1) sheet

PCT

NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

TETAZ, Franck
Rhône-Poulenc Agro
14/20, rue Pierre Baizet
F-69009 Lyon
FRANCE

REÇU D.P.I.

23 JUL. 1999

Date d'expédition (jour/mois/année) 13 juillet 1999 (13.07.99)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98032 PCT	
Demande internationale no PCT/FR99/01343	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 juin 1999 (08.06.99)	
Date de priorité (jour/mois/année) 10 juin 1998 (10.06.98)	
Déposant RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
10 juin 1998 (10.06.98)	98/07474	FR	07 juil 1999 (07.07.99)

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Philippe Bécamel

no de téléphone (41-22) 338.83.38

002730406

"Express Mail" mailing label
number EE617838829

Date of Deposit
-December 07, 2000-

I hereby certify that this paper or fee is
being deposited with the United States Postal
Service "Express Mail Post Office to
Addressee" service under 37CFR 1.10 on the
date indicated above and is addressed to the
Assistant Commissioner for Patents,
Washington, D.C. 20231

- Jean Marshall -
(Typed or printed name of person mailing
paper or fee)

Jean Marshall
(Signature of person mailing paper of fee)

TRAITE DE COOPERATION-EN MATIERE DE BREVETS

PH-98/032

PCT

(1) sheet

21 FEB. 2000

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

INFORMATIONS RELATIVES AUX
OFFICES ELUS QUI ONT RECU
NOTIFICATION DE LEUR ELECTION

(règle 61.3 du PCT)

TETAZ, Franck
Rhône-Poulenc Agro
14/20, rue Pierre Baizet
F-69009 Lyon
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 09 février 2000 (09.02.00)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98032 PCT		INFORMATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/01343	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 juin 1999 (08.06.99)	
Date de priorité (jour/mois/année) 10 juin 1998 (10.06.98)		
Déposant RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE etc		

1. Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BH, CA, CN, CZ, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, SK, US

2. Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils sont notifiés de leur élection; la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AL, BA, BB, CU, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MX, SG, SI, SL, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, ZA

3. Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité. Pour ce faire, il doit payer la ou les taxes nationales et remettre, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale (article 39.1)a) ainsi que, le cas échéant, une traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais supérieurs au délai mentionné ci-dessus. Pour des renseignements détaillés au sujet des délais applicables et des actes à accomplir à l'ouverture de la phase nationale auprès d'un office donné, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

L'ouverture de la phase régionale européenne est différée jusqu'à l'expiration d'un délai de 31 mois à compter de la date de priorité pour la totalité des Etats désignés aux fins de l'obtention d'un brevet européen.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Diana Nissen
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

"Express Mail" mailing label
number EE617838829

Date of Deposit
- December 07, 2000 -

I hereby certify that this paper or fee is
being deposited with the United States Postal
Service "Express Mail Post Office to
Assessors" office under 37CFR 1.10 on the
date indicated above and is addressed to the
Assistant Commissioner for Patents,
Washington, D.C. 20531

- Jean Marshall -

(Typed or printed name of person mailing
paper of fee)

Jean Marshall
(Signature of person mailing paper of fee)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01343

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplementary sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



1. Claims: 1-18

Industrial method for preparing heterologous proteins in E.coli, W strain.

2. Claims: 19, 20

E.coli W strain, characterised in that it comprises a system for expressing heterologous proteins whereof the promoter is the Ptrp promoter.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N9/78 C12N9/80 C12N15/71 C12N1/21
C12P21/02 //(C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE S. Y. ET CHANG H. N.: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, September 1993 (1993-09), pages 971-974, XP002094347 cited in the application	1-4, 7-10, 16, 17
Y	the whole document	5, 6, 14-20

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 1999

Date of mailing of the international search report

05. 11. 99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98032 PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 01343	Date du dépôt international(jour/mois/année) 08/06/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 10/06/1998
Déposant RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 6 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☒ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☒ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☒ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

Voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Cadre III TEXTE DE L'ABREGE (suit du point 5 de la première feuille)

La présente invention concerne un procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans E coli, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries E coli modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de E. coli est une souche E. coli W.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

T/FR 99/01343

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/55 C12N9/78 C12N9/80 C12N15/71 C12N1/21
C12P21/02 //(C12N1/21, C12R1:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEE S. Y. ET CHANG H. N.: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, septembre 1993 (1993-09), pages 971-974, XP002094347	1-4, 7-10, 16, 17
Y	cité dans la demande le document en entier --- -/--	5, 6, 14-20



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Macchia, G



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 596 812 A (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 mai 1994 (1994-05-11) cité dans la demande abrégé page 3, ligne 20-24 page 11, ligne 24-46 page 12, ligne 44,45 page 13; tableau 4 page 25 -page 28; revendications	5,6, 14-20
X	LEE J. ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, janvier 1997 (1997-01), pages 59-62, XP002094348 le document en entier	1-4,7-10
X	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 août 1992 (1992-08-05) page 7, ligne 8-22 page 8, ligne 30 -page 9, ligne 12 page 13, ligne 38 -page 15, ligne 32; exemple 9 page 21; revendication 4	1-4,7, 10-13, 16,17
X	WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 mars 1990 (1990-03-08) page 6, ligne 29-36 page 18, ligne 7-21; exemple 8 page 19, ligne 42 -page 23 page 26 -page 28; revendications	1-4, 7-13,16, 17
X	US 5 354 667 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 octobre 1994 (1994-10-11) colonne 6, ligne 4-11 colonne 7; tableau 1 colonne 8, ligne 49-59	1-4,7, 10-14, 16,17,19
X	EP 0 670 370 A (AJINOMOTO CO. INC. (JP); ONO E.; TSUJIMOTO N.; MATSUI K.; KURAHASHI O.) 6 septembre 1995 (1995-09-06) page 3, ligne 58 -page 5, ligne 9	1-4,7, 10-14, 16,17,19
A	WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 mai 1998 (1998-05-07) abrégé page 6, alinéa 2 page 21, ligne 10 -page 26, ligne 15; exemples 4,5	5,6,14, 18

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 mars 1990 (1990-03-22) figure 7 ---	15, 20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 novembre 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVIC, BRANKA ET AL: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" XP002117599 abrégé & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96 , 1968, ---	11-13
A	FR 2 128 587 A (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 octobre 1972 (1972-10-20) page 7, ligne 38 -page 8, ligne 35; exemple 2 ---	11-13
A	US 5 000 000 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 mars 1991 (1991-03-19) colonne 16; exemple 8 ---	11-13
A	US 4 246 346 A (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 janvier 1981 (1981-01-20) colonne 2, ligne 59 -colonne 3, ligne 20 -----	11-13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

/FR 99/01343

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0596812	A	11-05-1994	FR 2694571 A	11-02-1994
			BR 9305280 A	28-06-1994
			CA 2103616 A	11-02-1994
			DE 69314280 D	06-11-1997
			DE 69314280 T	05-02-1998
			ES 2108850 T	01-01-1998
			JP 7051070 A	28-02-1995
			MX 9304825 A	31-05-1994
			SG 48047 A	17-04-1998
			US 5629190 A	13-05-1997
			US 5635391 A	03-06-1997
EP 0496993	A	05-08-1992	IT 1252308 B	08-06-1995
			AT 137535 T	15-05-1996
			CA 2058216 A	22-06-1992
			DE 69119216 D	05-06-1996
			DE 69119216 T	05-09-1996
			ES 2086470 T	01-07-1996
			IE 75201 B	27-08-1997
			JP 2851021 B	27-01-1999
			JP 5211890 A	24-08-1993
			US 5424196 A	13-06-1995
WO 9002193	A	08-03-1990	US 5000000 A	19-03-1991
			CA 1335430 A	02-05-1995
			EP 0431047 A	12-06-1991
			JP 5502366 T	28-04-1993
			US 5554520 A	10-09-1996
			US 5482846 A	09-01-1996
			US 5028539 A	02-07-1991
			US 5821093 A	13-10-1998
			US 5916787 A	29-06-1999
			US 5424202 A	13-06-1995
			US 5487989 A	30-01-1996
US 5354667	A	11-10-1994	AT 151461 T	15-04-1997
			DE 69125541 D	15-05-1997
			DE 69125541 T	13-11-1997
			DK 469919 T	21-07-1997
			EP 0469919 A	05-02-1992
			GR 3023866 T	30-09-1997
			JP 6090746 A	05-04-1994
EP 0670370	A	06-09-1995	JP 7203980 A	08-08-1995
			BR 9500052 A	03-10-1995
			CN 1128295 A	07-08-1996
			US 5573945 A	12-11-1996
WO 9818941	A	07-05-1998	FR 2755143 A	30-04-1998
			AU 4951397 A	22-05-1998
			EP 0934419 A	11-08-1999
WO 9002800	A	22-03-1990	AT 98693 T	15-01-1994
			AU 620925 B	27-02-1992
			AU 4317189 A	02-04-1990
			CN 1041181 A	11-04-1990
			DE 68911461 D	27-01-1994
			DE 68911461 T	19-05-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9002800 A		DK 120290 A	16-07-1990
		EP 0363675 A	18-04-1990
		EP 0396664 A	14-11-1990
		ES 2061855 T	16-12-1994
		JP 2888575 B	10-05-1999
		JP 3501855 T	25-04-1991
		PT 91719 A,B	30-03-1990
		US 5352589 A	04-10-1994
		YU 179489 A	31-10-1991
FR 2128587 A	20-10-1972	JP 49011435 B	16-03-1974
		JP 48039693 A	11-06-1973
		JP 51005479 B	20-02-1976
		DE 2209591 A	14-09-1972
US 5000000 A	19-03-1991	CA 1335430 A	02-05-1995
		EP 0431047 A	12-06-1991
		JP 5502366 T	28-04-1993
		WO 9002193 A	08-03-1990
		US 5482846 A	09-01-1996
		US 5821093 A	13-10-1998
		US 5916787 A	29-06-1999
		US 5424202 A	13-06-1995
		US 5487989 A	30-01-1996
		US 5554520 A	10-09-1996
		US 5028539 A	02-07-1991
US 4246346 A	20-01-1981	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. nde internationale n°

PCT/FR 99/01343

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite au point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4 a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

Voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°.
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°.

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR PCT/ISA/ 210

1. revendications: 1-18

Procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans E.coli, souche W.

2. revendications: 19, 20

Souche E.coli W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur Ptrp.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr. Internationale No
PCT/FR 99/01343

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
CIB 6	C12N15/55 C12P21/02	C12N9/78 C12N15/71 C12N1/21 /(C12N1/21, C12R1:19)
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEE S. Y. ET CHANG H. N.: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, septembre 1993 (1993-09), pages 971-974, XP002094347	1-4, 7-10, 16, 17
Y	cité dans la demande le document en entier --- -/-	5, 6, 14-20
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
5 octobre 1999		05.11.99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Macchia, G



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No

PCI/FR 99/01343

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 596 812 A (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 mai 1994 (1994-05-11) cité dans la demande abrégé page 3, ligne 20-24 page 11, ligne 24-46 page 12, ligne 44,45 page 13; tableau 4 page 25 -page 28; revendications ---	5,6, 14-20
X	LEE J. ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, janvier 1997 (1997-01), pages 59-62, XP002094348 le document en entier ---	1-4,7-10
X	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 août 1992 (1992-08-05) page 7, ligne 8-22 page 8, ligne 30 -page 9, ligne 12 page 13, ligne 38 -page 15, ligne 32; exemple 9 page 21; revendication 4 ---	1-4,7, 10-13, 16,17
X	WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 mars 1990 (1990-03-08) page 6, ligne 29-36 page 18, ligne 7-21; exemple 8 page 19, ligne 42 -page 23 page 26 -page 28; revendications ---	1-4, 7-13,16, 17
X	US 5 354 667 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 octobre 1994 (1994-10-11) colonne 6, ligne 4-11 colonne 7; tableau 1 colonne 8, ligne 49-59 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
X	EP 0 670 370 A (AJINOMOTO CO. INC. (JP); ONO E.; TSUJIMOTO N.; MATSUI K.; KURAHASHI O.) 6 septembre 1995 (1995-09-06) page 3, ligne 58 -page 5, ligne 9 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
A	WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 mai 1998 (1998-05-07) abrégé page 6, alinéa 2 page 21, ligne 10 -page 26, ligne 15; exemples 4,5 ---	5,6,14, 18

-/--



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. "e Internationale No

PC1/FR 99/01343

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 mars 1990 (1990-03-22) figure 7	15,20
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 novembre 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVCIC, BRANKA ET AL: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" XP002117599 abrégé & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968,	11-13
A	--- FR 2 128 587 A (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 octobre 1972 (1972-10-20) page 7, ligne 38 -page 8, ligne 35; exemple 2	11-13
A	--- US 5 000 000 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 mars 1991 (1991-03-19) colonne 16; exemple 8	11-13
A	--- US 4 246 346 A (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 janvier 1981 (1981-01-20) colonne 2, ligne 59 -colonne 3, ligne 20 -----	11-13



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : Membres de familles de brevets

Données internationales No

PCI/FR 99/01343

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0596012 A	11-05-1994	FR 2694571 A	11-02-1994
		BR 9305280 A	28-06-1994
		CA 2103616 A	11-02-1994
		DE 69314280 D	06-11-1997
		DE 69314280 T	05-02-1998
		ES 2108850 T	01-01-1998
		JP 7051070 A	28-02-1995
		MX 9304825 A	31-05-1994
		SG 48047 A	17-04-1998
		US 5629190 A	13-05-1997
		US 5635391 A	03-06-1997
EP 0496993 A	05-08-1992	IT 1252308 B	08-06-1995
		AT 137535 T	15-05-1996
		CA 2058216 A	22-06-1992
		DE 69119216 D	05-06-1996
		DE 69119216 T	05-09-1996
		ES 2086470 T	01-07-1996
		IE 75201 B	27-08-1997
		JP 2851021 B	27-01-1999
		JP 5211890 A	24-08-1993
		US 5424196 A	13-06-1995
WO 9002193 A	08-03-1990	US 5000000 A	19-03-1991
		CA 1335430 A	02-05-1995
		EP 0431047 A	12-06-1991
		JP 5502366 T	28-04-1993
		US 5554520 A	10-09-1996
		US 5482846 A	09-01-1996
		US 5028539 A	02-07-1991
		US 5821093 A	13-10-1998
		US 5916787 A	29-06-1999
		US 5424202 A	13-06-1995
		US 5487989 A	30-01-1996
US 5354667 A	11-10-1994	ES 2020792 A	16-09-1991
		AT 151461 T	15-04-1997
		DE 69125541 D	15-05-1997
		DE 69125541 T	13-11-1997
		DK 469919 T	21-07-1997
		EP 0469919 A	05-02-1992
		GR 3023866 T	30-09-1997
		JP 6090746 A	05-04-1994
EP 0670370 A	06-09-1995	JP 7203980 A	08-08-1995
		BR 9500052 A	03-10-1995
		CN 1128295 A	07-08-1996
		US 5573945 A	12-11-1996
WO 9818941 A	07-05-1998	FR 2755143 A	30-04-1998
		AU 4951397 A	22-05-1998
		CZ 9901454 A	11-08-1999
		EP 0934419 A	11-08-1999
WO 9002800 A	22-03-1990	AT 98693 T	15-01-1994
		AU 620925 B	27-02-1992
		AU 4317189 A	02-04-1990
		CN 1041181 A	11-04-1990



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

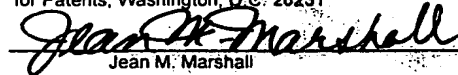
Demr Internationale No

PCT/FR 99/01343

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9002800 A		DE 68911461 D	27-01-1994
		DE 68911461 T	19-05-1994
		DK 120290 A	16-07-1990
		EP 0363675 A	18-04-1990
		EP 0396664 A	14-11-1990
		ES 2061855 T	16-12-1994
		JP 2888575 B	10-05-1999
		JP 3501855 T	25-04-1991
		NZ 230621 A	25-06-1992
		PT 91719 A,B	30-03-1990
		US 5352589 A	04-10-1994
		YU 179489 A	31-10-1991
FR 2128587 A	20-10-1972	JP 49011435 B	16-03-1974
		JP 48039693 A	11-06-1973
		JP 51005479 B	20-02-1976
		DE 2209591 A	14-09-1972
US 5000000 A	19-03-1991	CA 1335430 A	02-05-1995
		EP 0431047 A	12-06-1991
		JP 5502366 T	28-04-1993
		WO 9002193 A	08-03-1990
		US 5482846 A	09-01-1996
		US 5821093 A	13-10-1998
		US 5916787 A	29-06-1999
		US 5424202 A	13-06-1995
		US 5487989 A	30-01-1996
		US 5554520 A	10-09-1996
		US 5028539 A	02-07-1991
US 4246346 A	20-01-1981	AUCUN	

"Express Mail" mailing label number: E: 7838826US
Date of Deposit: December 7, 2000

I hereby certify that this paper or fee is being deposited
with the United States Postal Service "Express Mail"
Post Office to Addressee" service under 37 C.F.R. 1.10 on
the dated indicated above is addressed to the Commissioner
for Patents, Washington, D.C. 20231


Jean M. Marshall

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 t règl s 43 t 44 du PCT)

modified version

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98032 PCT	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 99/01343	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/06/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 10/06/1998
Déposant RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend _____ **7** _____ feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☒ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☒ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☒ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

Voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

1. revendications: 1-18

Procédé industriel de preparation de protéines hétérologues dans E.coli, souche W.

2. revendications: 19, 20

Souche E.coli W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur Ptrp.

Cadre III TEXTE DE L'ABREGE (suite du p int 5 d la premièr feuille)

La présente invention concerne un procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans E coli, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries E coli modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de E. coli est une souche E. coli W.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No
FR 99/01343

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/55 C12N9/78 C12N9/80 C12N15/71 C12N1/21
C12P21/02 //(C12N1/21,C12R1:19)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEE S. Y. ET CHANG H. N.: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, septembre 1993 (1993-09), pages 971-974, XP002094347	1-4, 7-10,16, 17
Y	cité dans la demande le document en entier --- -/--	5,6, 14-20

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05. 11. 99

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Macchia, G



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 596 812 A (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 mai 1994 (1994-05-11) cité dans la demande abrégé page 3, ligne 20-24 page 11, ligne 24-46 page 12, ligne 44,45 page 13; tableau 4 page 25 -page 28; revendications	5,6, 14-20
X	LEE J. ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, janvier 1997 (1997-01), pages 59-62, XP002094348 le document en entier	1-4,7-10
X	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 août 1992 (1992-08-05) page 7, ligne 8-22 page 8, ligne 30 -page 9, ligne 12 page 13, ligne 38 -page 15, ligne 32; exemple 9 page 21; revendication 4	1-4,7, 10-13, 16,17
X	WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 mars 1990 (1990-03-08) page 6, ligne 29-36 page 18, ligne 7-21; exemple 8 page 19, ligne 42 -page 23 page 26 -page 28; revendications	1-4, 7-13,16, 17
X	US 5 354 667 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 octobre 1994 (1994-10-11) colonne 6, ligne 4-11 colonne 7; tableau 1 colonne 8, ligne 49-59	1-4,7, 10-14, 16,17,19
X	EP 0 670 370 A (AJINOMOTO CO. INC. (JP); ONO E.; TSUJIMOTO N.; MATSUI K.; KURAHASHI O.) 6 septembre 1995 (1995-09-06) page 3, ligne 58 -page 5, ligne 9	1-4,7, 10-14, 16,17,19
A	WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 mai 1998 (1998-05-07) abrégé page 6, alinéa 2 page 21, ligne 10 -page 26, ligne 15; exemples 4,5	5,6,14, 18

	-/--	



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 mars 1990 (1990-03-22) figure 7	15,20
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 novembre 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVIC, BRANKA ET AL: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" XP002117599 abrégé & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968,	11-13
A	--- FR 2 128 587 A (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 octobre 1972 (1972-10-20) page 7, ligne 38 -page 8, ligne 35; exemple 2	11-13
A	--- US 5 000 000 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 mars 1991 (1991-03-19) colonne 16; exemple 8	11-13
A	--- US 4 246 346 A (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 janvier 1981 (1981-01-20) colonne 2, ligne 59 -colonne 3, ligne 20 -----	11-13



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

/FR 99/01343

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0596812	A	11-05-1994	FR 2694571 A	11-02-1994
			BR 9305280 A	28-06-1994
			CA 2103616 A	11-02-1994
			DE 69314280 D	06-11-1997
			DE 69314280 T	05-02-1998
			ES 2108850 T	01-01-1998
			JP 7051070 A	28-02-1995
			MX 9304825 A	31-05-1994
			SG 48047 A	17-04-1998
			US 5629190 A	13-05-1997
			US 5635391 A	03-06-1997
EP 0496993	A	05-08-1992	IT 1252308 B	08-06-1995
			AT 137535 T	15-05-1996
			CA 2058216 A	22-06-1992
			DE 69119216 D	05-06-1996
			DE 69119216 T	05-09-1996
			ES 2086470 T	01-07-1996
			IE 75201 B	27-08-1997
			JP 2851021 B	27-01-1999
			JP 5211890 A	24-08-1993
			US 5424196 A	13-06-1995
WO 9002193	A	08-03-1990	US 5000000 A	19-03-1991
			CA 1335430 A	02-05-1995
			EP 0431047 A	12-06-1991
			JP 5502366 T	28-04-1993
			US 5554520 A	10-09-1996
			US 5482846 A	09-01-1996
			US 5028539 A	02-07-1991
			US 5821093 A	13-10-1998
			US 5916787 A	29-06-1999
			US 5424202 A	13-06-1995
			US 5487989 A	30-01-1996
US 5354667	A	11-10-1994	ES 2020792 A	16-09-1991
			AT 151461 T	15-04-1997
			DE 69125541 D	15-05-1997
			DE 69125541 T	13-11-1997
			DK 469919 T	21-07-1997
			EP 0469919 A	05-02-1992
			GR 3023866 T	30-09-1997
			JP 6090746 A	05-04-1994
EP 0670370	A	06-09-1995	JP 7203980 A	08-08-1995
			BR 9500052 A	03-10-1995
			CN 1128295 A	07-08-1996
			US 5573945 A	12-11-1996
WO 9818941	A	07-05-1998	FR 2755143 A	30-04-1998
			AU 4951397 A	22-05-1998
			CZ 9901454 A	11-08-1999
			EP 0934419 A	11-08-1999
WO 9002800	A	22-03-1990	AT 98693 T	15-01-1994
			AU 620925 B	27-02-1992
			AU 4317189 A	02-04-1990
			CN 1041181 A	11-04-1990



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

FR 99/01343

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9002800 A		DE 68911461 D DE 68911461 T DK 120290 A EP 0363675 A EP 0396664 A ES 2061855 T JP 2888575 B JP 3501855 T NZ 230621 A PT 91719 A,B US 5352589 A YU 179489 A	27-01-1994 19-05-1994 16-07-1990 18-04-1990 14-11-1990 16-12-1994 10-05-1999 25-04-1991 25-06-1992 30-03-1990 04-10-1994 31-10-1991
FR 2128587 A	20-10-1972	JP 49011435 B JP 48039693 A JP 51005479 B DE 2209591 A	16-03-1974 11-06-1973 20-02-1976 14-09-1972
US 5000000 A	19-03-1991	CA 1335430 A EP 0431047 A JP 5502366 T WO 9002193 A US 5482846 A US 5821093 A US 5916787 A US 5424202 A US 5487989 A US 5554520 A US 5028539 A	02-05-1995 12-06-1991 28-04-1993 08-03-1990 09-01-1996 13-10-1998 29-06-1999 13-06-1995 30-01-1996 10-09-1996 02-07-1991
US 4246346 A	20-01-1981	AUCUN	

REC'D 22 SEP 2000

PCT



WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

16 T

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98032 PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01343	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/06/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 10/06/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/55		
Déposant RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 11 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapportII <input type="checkbox"/> PrioritéIII <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielleIV <input checked="" type="checkbox"/> Absence d'unité de l'inventionV <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclarationVI <input type="checkbox"/> Certains documents citésVII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationaleVIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06/01/2000	Date d'achèvement du présent rapport 19.09.2000	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Surdej, P N° de téléphone +49 89 2399 7334 	

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/01343

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-20 version initiale

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
- ☐ limité les revendications.
 - ☐ payé des taxes additionnelles.
 - ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01343

- ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.
3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,
- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
- voir feuille séparée**
4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :
- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n^{os} .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 5-6,9,12-15,18-20
	Non : Revendications 1-4,7-8,10-11,16-17
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-20
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-20
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

voir feuille s´parée

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01343

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1:** LEE S. Y. ET CHANG H. N.: 'High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source' BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, septembre 1993 (1993-09), pages 971-974, cité dans la demande
- D2:** EP-A-0 596 812 (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 mai 1994 (1994-05-11) cité dans la demande
- D3:** LEE J. ET AL.: 'Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source' BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, janvier 1997 (1997-01), pages 59-62
- D4:** EP-A-0 496 993 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 août 1992 (1992-08-05)
- D5:** WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 mars 1990 (1990-03-08)
- D6:** WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 mai 1998 (1998-05-07)
- D7:** WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 mars 1990 (1990-03-22)
- D8:** CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 novembre 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVCIC, BRANKA ET AL: 'Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637' & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968,
- D9:** FR-A-2 128 587 (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 octobre 1972 (1972-10-20)
- D10:** US-A-5 000 000 (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 mars 1991 (1991-03-19)
- D11:** US-A-5 354 667 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 octobre 1994 (1994-10-11)
- D12:** US-A-4 246 346 (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 janvier 1981 (1981-01-20)

Introduction

La demande divulgue un procédé de préparation de protéines hétérologues dans E.coli W et des souches correspondantes.

Concernant le point I

Base de l'opinion

Les pages 1-4 du listage des séquences no. 1-4 filed on 1st July 1999 ne font pas partie de la demande (règle 13ter. 1 f) PCT).

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

Les revendications 1-18 concernent un procédé industriel de préparation de protéine hétérologues dans une souche E.coli W. Les revendications 19-20 concernent une souche E.coli W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur P_{trp}. Les revendications indépendantes 1 et 19 ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général (règle 13.1 PCT), et ce pour les raisons suivantes:

Les caractéristiques techniques de ces revendications, à savoir une souche E.coli W et un système d'expression de protéines hétérologues ainsi que leur combinaison (voir point V 2), sont déjà connus et n'impliquent pas d'activité inventive. L'exigence d'unité de l'invention (règle 13.1 PCT) n'est donc pas observée, dans la mesure où il n'existe pas entre les revendications indépendantes de relation technique portant sur un ou plusieurs "éléments techniques particuliers" au sens de la règle 13.2 PCT.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

2) Nouveauté (Art. 33.1 et 2)

Les revendications 1-3 ne sont pas nouvelles si l'on considère le document **D4**. Un système d'expression de protéine hétérologue (la Gl-7-ACA cyclase) est utilisé dans la souche E.coli **W** ATCC 9637 (Exemple 9, page 14, lignes 26-27 et 51 et revendication 4). De plus, un dérivé de la souche E.coli W ATCC 9637 est obtenu

par sélection clonale et manipulation génétique (page 14, lignes 49-50).

La revendication 4 n'est pas nouvelle à la lumière de D4. Une forte teneur en protéines hétérologues (page 15, ligne 4) et une forte densité en biomasse (page 15, lignes 29-32) sont produites.

Les revendications 7-8 ne sont pas nouvelles puisque le document D4 mentionne l'utilisation de saccharose pour préparer le milieu de culture (page 8, ligne 44). De plus, la souche E.coli W ATCC 9637 est bien connue pour sa capacité à utiliser le sucrose **D5** (page 6, lignes 33-36), **D1** (page 971, introduction), **D10** (colonne 6, lignes 49- 53).

Lorsque l'on considère D4, les revendications 10-11 ne sont pas nouvelles. En effet, des sources d'azote comme les extraits de levure sont mentionnées (page 15, ligne 23).

Les revendications 16-17 ne sont pas nouvelles car la GI-7-ACA acylase, décrite dans le document D4 est une enzyme (par exemple: page 9, ligne 16).

3) **Activité inventive (Art. 33.1 et 3)**

Les revendications 5-6 sont nouvelles mais elles ne sont pas inventives. En effet, le promoteur tryptophane est connu lorsque l'on considère l'état de la technique antérieure (**D2**: page 11, ligne 24 et **D6**: page 25, ligne 5), et dans ces cas, le tryptophane est ajouté au milieu (**D2**: page 11, ligne 42 et **D6**: page 25, ligne 11). Les quantités de tryptophane ajoutées sont habituellement de 0,1 g/l. Comme il n'est pas mentionné dans la description que les concentrations de tryptophane données dans la revendication 6 présente un avantage quelconque, cette revendication ne présente donc pas d'activité inventive.

La revendication 9 semble être nouvelle puisque le document D4 ne mentionne pas de quantité spécifique mais elle n'est pas inventive puisque les documents **D1**, **D3** et **D5** indiquent les quantités, respectivement 20 g/l (page 972, materials and methods), 15 g/l (materials and methods) et 2% (page 19, ligne 43), ajoutées au milieu de culture de E.coli W ATCC 9637.

Les revendications 12-13 sont nouvelles mais ne présentent pas d'activité inventive puisque les protéines de viande ou les peptones sont envisagés très souvent comme alternatives à d'autres sources d'azote (**D11**: colonne 8, ligne 53, **D9**: page 7, ligne 15, **D12**: colonne 3, ligne 16 et table II). En particulier dans **D8**, la souche E.coli W ATCC 9637 a une croissance augmentée en présence de peptones. De plus, les intervalles de concentration donnés dans la revendication 12 sont suffisamment larges pour être couverts par les sources communes d'azote organiques comme les peptones, les extraits de levure, etc...

Les revendications 14-15 et 19-20 sont nouvelles mais ne comportent pas d'activité inventive car le document **D7** (page 13, paragraphe 3) décrit une séquence qui est à 93,4% identique à celle décrite dans l'application. En particulier, les séquences du promoteur P_{trp} et du site de fixation du ribosome du gène *cII* du phage semblent entièrement conservées. La combinaison du promoteur P_{trp} avec la souche E.coli W est donc évidente à la lumière des documents D4 et D7.

La revendication 18 est nouvelle mais elle ne montre pas d'activité inventive lorsque l'on considère D2 et D6 en combinaison avec D4. Les documents D2 (page 11, ligne 24) et D6 (page 25, ligne 5) concerne l'expression de nitrilase sous contrôle du promoteur tryptophane dans E.coli TG1 (D2: exemple 5) et DH5 α (D6: exemple 5). Le choix de la souche E.coli W ATCC 9637 est évident puisque cette souche peut utiliser le sucrose. En particulier, si l'on considère que la souche E.coli W ATCC 9637 est bien connue pour sa capacité à utiliser le sucrose D5 (page 6, lignes 33-36), D1 (page 971, introduction), D10 (colonne 6, lignes 49-53) alors que d'autres souches de E.coli couramment utilisées ne le peuvent pas (par exemple voir le document D5: page 20, ligne 9).

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

- a) Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D3-D5, D7-D12 et ne cite pas ces documents.

- b) La définition de l'expression "protéine hétérologue" n'est pas claire. En effet, la phrase page 7 ligne 31-33 "ou bien encore d'une protéine produite naturellement...régulation distincts de ceux du système d'expression selon l'invention" est en contradiction avec la phrase page 7, lignes 25-27 "Par protéine hétérologue, on entend..." qui affirme qu'une protéine hétérologue est une protéine qui ne se trouve pas naturellement dans E.coli W. De plus, si l'expression de la protéine hétérologue est contrôlée par des éléments de régulation distincts de ceux du système d'expression selon l'invention, la description va au-delà de ce qui est revendiqué (Art. 5 PCT).
- c) La phrase page 7, lignes 22-24 "les gènes dont la coexpression favorise...sont compris dans le système d'expression selon l'invention" semble suggérer que la description va au-delà des revendications en introduisant une caractéristique pas suffisamment définie, ce qui rend la description obscure (Art. 5 PCT)
- d) Dans la description, concernant les documents "demande CIP No 08/194,588" (page 7, ligne 13) et "demande FR96/13077" (page 9, lignes 29-31), il n'est pas clair à quels documents le déposant fait référence. En conséquences, certaines caractéristiques de l'invention ne sont pas claires et il ne peut pas être déterminé si l'invention peut être exécutée par un homme du métier (Art. 5 PCT)
- e) Les phrases page 10, ligne 22 "Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 5..." et page 10, ligne 27 "Les mesures d'activité nitrilasique...comme décrit..." se réfèrent à d'autres documents pour les conditions de culture et les mesures d'activité nitrilasique. De même, la phrase page 12, ligne 2 "les mesures d'activité polyamide hydrolase...comme décrit dans la demande WO 97/04083..." se réfère à un autre document pour les mesures d'activité polyamide hydrolase. La demande devant être compréhensible par elle-même, les conditions ne peuvent pas être introduites par référence, elles doivent être spécifiées (Art. 5 PCT).
- f) Certains plasmides par exemple pXL2035 (page 10, ligne 19), pRPG9 et pSL301 (Exemple 11, pages 20-21), pRPA-BCAT37 (page 23, ligne 25), RSF1010D20 (page 23, ligne 27) ne sont décrits que par référence à d'autres documents. Les plasmides ne sont pas suffisamment décrits pour que la demande soit

compréhensible par elle-même (Art. 5 PCT).

- g) Le tableau 6 (page 22) compare deux souches différentes: DH5 α et W. Il n'est donc pas clair comment l'utilisation du locus *cer* peut améliorer la productivité (Art. 5 PCT).
- h) La souche L21 n'est pas définie, ce qui rend la description obscure (Art. 5 PCT)
- i) les expressions "de préférence" dans les revendications 5 et 9, indiquent que, respectivement, les caractéristiques "entre 0,1 et 0,3 g/l" et "entre 0,5 et 200 g/l" sont entièrement facultatives. De même, l'expression "en particulier", dans la revendication 13, indique que la caractéristique "les dérivés de protéines de pomme de terre" est entièrement facultative (Directives concernant l'examen préliminaire international III 4.6 PCT).
- j) L'expression "additifs appropriés" dans le paragraphe 2, page 6 n'est pas claire parce que n'importe quel additif peut être considéré, cela rend l'étendue de l'invention mal définie (Art. 5 PCT).
- k) Si par exemple polymérase *pfu* (page 23, lignes 18-19) et *Quiaex* (page 25 ligne 18) sont des marques déposées, le fait qu'elles ne soient pas reconnues comme telles rend la description obscure (Directives concernant l'examen préliminaire international II 4.16 PCT).
- l) L'abréviation HMTBA (tableau 1, page 11) n'est pas définie dans la description, ce qui rend cette dernière obscure (Art. 5 PCT).
- m) Les termes "représente" (page 8 ligne 31), D20 (page 9 ligne 6), "est" (page 6 ligne 32), figure 2 (page 26 ligne 16), "contant" (page 9 ligne 27) ne sont pas clairs et rendent la description obscure (Art. 5 PCT).

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

- a) Il ressort clairement de la description et de la revendication 19 que l'utilisation

d'un promoteur P_{trp} est essentielle à la définition de l'invention. La revendication indépendante 1, ne contenant pas cette caractéristique, ne remplit pas la condition visée à l'article 6 PCT en combinaison avec la règle 6.3 b) PCT, qui prévoient qu'une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention.

- b) Dans la revendication 14 et dans la description (par exemple: page 7, ligne 6) le promoteur P_{trp} n'est pas défini. L'origine du promoteur n'étant pas spécifiée, la revendication 14 et la description ne sont pas claires (Art. 5 et 6 PCT).
- c) Dans la revendication 4 le terme "forte" utilisé dans la revendication ayant un sens relatif, il laisse planer un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles il se réfère. L'objet de ladite revendication n'est donc pas clairement défini (article 6 et Directives concernant l'examen préliminaire international III 4.5a PCT).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGEE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

→ H M clt
U J

PCT

Destinataire:

TETAZ, Franck
RHONE-POULENC AGRO
DPI
B.P. 9163
F-69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

PH-98/032 PCT/IPEA/416 & 409

(12) pages

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 19.09.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
PH 98032 PCT

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/01343

Date du dépôt international (jour/mois/année)
08/06/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
10/06/1998

Déposant
RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.

2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.

3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Vullo, C

Tél. +49 89 2399-8061





TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)


Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98032 PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01343	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/06/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 10/06/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/55		
Déposant RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 11 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☒ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06/01/2000	Date d'achèvement du présent rapport 19.09.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Surdej, P N° de téléphone +49 89 2399 7334





**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01343

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-20 version initiale

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
- ☐ limité les revendications.
- ☐ payé des taxes additionnelles.
- ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01343

- ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.
3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,
- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée
4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :
- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n°s .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 5-6,9,12-15,18-20
	Non : Revendications 1-4,7-8,10-11,16-17
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-20
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-20
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

voir feuille séparée



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01343

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée



Il est fait référence aux documents suivants:

- D1:** LEE S. Y. ET CHANG H. N.: 'High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source' BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, septembre 1993 (1993-09), pages 971-974, cité dans la demande
- D2:** EP-A-0 596 812 (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 mai 1994 (1994-05-11) cité dans la demande
- D3:** LEE J. ET AL.: 'Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source' BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, janvier 1997 (1997-01), pages 59-62
- D4:** EP-A-0 496 993 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 août 1992 (1992-08-05)
- D5:** WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 mars 1990 (1990-03-08)
- D6:** WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 mai 1998 (1998-05-07)
- D7:** WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 mars 1990 (1990-03-22)
- D8:** CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 novembre 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVCIC, BRANKA ET AL: 'Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637' & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968,
- D9:** FR-A-2 128 587 (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 octobre 1972 (1972-10-20)
- D10:** US-A-5 000 000 (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 mars 1991 (1991-03-19)
- D11:** US-A-5 354 667 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 octobre 1994 (1994-10-11)
- D12:** US-A-4 246 346 (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 janvier 1981 (1981-01-20)

Introduction

La demande divulgue un procédé de préparation de protéines hétérologues dans E.coli W et des souches correspondantes.

Concernant le point I

Base de l'opinion

Les pages 1-4 du listage des séquences no. 1-4 filed on 1st July 1999 ne font pas partie de la demande (règle 13ter. 1 f) PCT).

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

Les revendications 1-18 concernent un procédé industriel de préparation de protéine hétérologues dans une souche E.coli W. Les revendications 19-20 concernent une souche E.coli W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur P_{trp}. Les revendications indépendantes 1 et 19 ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général (règle 13.1 PCT), et ce pour les raisons suivantes:

Les caractéristiques techniques de ces revendications, à savoir une souche E.coli W et un système d'expression de protéines hétérologues ainsi que leur combinaison (voir point V 2), sont déjà connus et n'impliquent pas d'activité inventive. L'exigence d'unité de l'invention (règle 13.1 PCT) n'est donc pas observée, dans la mesure où il n'existe pas entre les revendications indépendantes de relation technique portant sur un ou plusieurs "éléments techniques particuliers" au sens de la règle 13.2 PCT.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

2) Nouveauté (Art. 33.1 et 2)

Les revendications 1-3 ne sont pas nouvelles si l'on considère le document **D4**. Un système d'expression de protéine hétérologue (la Gl-7-ACA cyclase) est utilisé dans la souche E.coli **W** ATCC 9637 (Exemple 9, page 14, lignes 26-27 et 51 et revendication 4). De plus, un dérivé de la souche E.coli W ATCC 9637 est obtenu



par sélection clonale et manipulation génétique (page 14, lignes 49-50).

La revendication 4 n'est pas nouvelle à la lumière de D4. Une forte teneur en protéines hétérologues (page 15, ligne 4) et une forte densité en biomasse (page 15, lignes 29-32) sont produites.

Les revendications 7-8 ne sont pas nouvelles puisque le document D4 mentionne l'utilisation de saccharose pour préparer le milieu de culture (page 8, ligne 44). De plus, la souche E.coli W ATCC 9637 est bien connue pour sa capacité à utiliser le sucrose **D5** (page 6, lignes 33-36), **D1** (page 971, introduction), **D10** (colonne 6, lignes 49- 53).

Lorsque l'on considère D4, les revendications 10-11 ne sont pas nouvelles. En effet, des sources d'azote comme les extraits de levure sont mentionnées (page 15, ligne 23).

Les revendications 16-17 ne sont pas nouvelles car la Gl-7-ACA acylase, décrite dans le document D4 est une enzyme (par exemple: page 9, ligne 16).

3) **Activité inventive (Art. 33.1 et 3)**

Les revendications 5-6 sont nouvelles mais elles ne sont pas inventives. En effet, le promoteur tryptophane est connu lorsque l'on considère l'état de la technique antérieure (**D2**: page 11, ligne 24 et **D6**: page 25, ligne 5), et dans ces cas, le tryptophane est ajouté au milieu (**D2**: page 11, ligne 42 et **D6**: page 25, ligne 11). Les quantités de tryptophane ajoutées sont habituellement de 0,1 g/l. Comme il n'est pas mentionné dans la description que les concentrations de tryptophane données dans la revendication 6 présente un avantage quelconque, cette revendication ne présente donc pas d'activité inventive.

La revendication 9 semble être nouvelle puisque le document D4 ne mentionne pas de quantité spécifique mais elle n'est pas inventive puisque les documents D1, **D3** et D5 indiquent les quantités, respectivement 20 g/l (page 972, materials and methods), 15 g/l (materials and methods) et 2% (page 19, ligne 43), ajoutées au milieu de culture de E.coli W ATCC 9637.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is crucial for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part of the document outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. It includes a detailed description of the data collection process, from identifying sources to implementing the collection strategy.

3. The third part of the document provides a comprehensive overview of the data analysis techniques employed. It covers both qualitative and quantitative methods, highlighting the strengths and limitations of each approach.

4. The fourth part of the document discusses the results of the data analysis and the insights gained. It includes a detailed interpretation of the findings, highlighting key trends and patterns that emerged from the data.

5. The fifth part of the document provides a summary of the findings and conclusions. It reiterates the main points of the analysis and offers recommendations for future research and action based on the insights gained.

6. The sixth part of the document includes a detailed appendix of the data collected and analyzed. This section provides a comprehensive overview of the raw data, allowing for a more in-depth understanding of the information used in the analysis.

7. The seventh part of the document provides a final summary and conclusion. It reiterates the main findings and offers a final perspective on the overall results of the study.

8. The eighth part of the document includes a list of references and a bibliography. This section provides a comprehensive overview of the sources used in the research, ensuring that all information is properly cited and documented.

Les revendications 12-13 sont nouvelles mais ne présentent pas d'activité inventive puisque les protéines de viande ou les peptones sont envisagés très souvent comme alternatives à d'autres sources d'azote (**D11**: colonne 8, ligne 53, **D9**: page 7, ligne 15, **D12**: colonne 3, ligne 16 et table II). En particulier dans **D8**, la souche E.coli W ATCC 9637 a une croissance augmentée en présence de peptones. De plus, les intervalles de concentration donnés dans la revendication 12 sont suffisamment larges pour être couverts par les sources communes d'azote organiques comme les peptones, les extraits de levure, etc...

Les revendications 14-15 et 19-20 sont nouvelles mais ne comportent pas d'activité inventive car le document **D7** (page 13, paragraphe 3) décrit une séquence qui est à 93,4% identique à celle décrite dans l'application. En particulier, les séquences du promoteur P_{trp} et du site de fixation du ribosome du gène cII du phage semblent entièrement conservées. La combinaison du promoteur P_{trp} avec la souche E.coli W est donc évidente à la lumière des documents D4 et D7.

La revendication 18 est nouvelle mais elle ne montre pas d'activité inventive lorsque l'on considère D2 et D6 en combinaison avec D4. Les documents D2 (page 11, ligne 24) et D6 (page 25, ligne 5) concerne l'expression de nitrilase sous contrôle du promoteur tryptophane dans E.coli TG1 (D2: exemple 5) et DH5 α (D6: exemple 5). Le choix de la souche E.coli W ATCC 9637 est évident puisque cette souche peut utiliser le sucrose. En particulier, si l'on considère que la souche E.coli W ATCC 9637 est bien connue pour sa capacité à utiliser le sucrose D5 (page 6, lignes 33-36), D1 (page 971, introduction), D10 (colonne 6, lignes 49-53) alors que d'autres souches de E.coli couramment utilisées ne le peuvent pas (par exemple voir le document D5: page 20, ligne 9).

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

- a) Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D3-D5, D7-D12 et ne cite pas ces documents.

the first of these is the fact that the
the second is the fact that the
the third is the fact that the
the fourth is the fact that the
the fifth is the fact that the
the sixth is the fact that the
the seventh is the fact that the
the eighth is the fact that the
the ninth is the fact that the
the tenth is the fact that the

the first of these is the fact that the
the second is the fact that the
the third is the fact that the
the fourth is the fact that the
the fifth is the fact that the
the sixth is the fact that the
the seventh is the fact that the
the eighth is the fact that the
the ninth is the fact that the
the tenth is the fact that the

the first of these is the fact that the
the second is the fact that the
the third is the fact that the
the fourth is the fact that the
the fifth is the fact that the
the sixth is the fact that the
the seventh is the fact that the
the eighth is the fact that the
the ninth is the fact that the
the tenth is the fact that the

the first of these is the fact that the
the second is the fact that the
the third is the fact that the
the fourth is the fact that the
the fifth is the fact that the
the sixth is the fact that the
the seventh is the fact that the
the eighth is the fact that the
the ninth is the fact that the
the tenth is the fact that the

- b) La définition de l'expression "protéine hétérologue" n'est pas claire. En effet, la phrase page 7 ligne 31-33 "ou bien encore d'une protéine produite naturellement...régulation distincts de ceux du système d'expression selon l'invention" est en contradiction avec la phrase page 7, lignes 25-27 "Par protéine hétérologue, on entend..." qui affirme qu'une protéine hétérologue est une protéine qui ne se trouve pas naturellement dans E.coli W. De plus, si l'expression de la protéine hétérologue est contrôlée par des éléments de régulation distincts de ceux du système d'expression selon l'invention, la description va au-delà de ce qui est revendiqué (Art. 5 PCT).
- c) La phrase page 7, lignes 22-24 "les gènes dont la coexpression favorise...sont compris dans le système d'expression selon l'invention" semble suggérer que la description va au-delà des revendications en introduisant une caractéristique pas suffisamment définie, ce qui rend la description obscure (Art. 5 PCT)
- d) Dans la description, concernant les documents "demande CIP No 08/194,588" (page 7, ligne 13) et "demande FR96/13077" (page 9, lignes 29-31), il n'est pas clair à quels documents le déposant fait référence. En conséquences, certaines caractéristiques de l'invention ne sont pas claires et il ne peut pas être déterminé si l'invention peut être exécutée par un homme du métier (Art. 5 PCT)
- e) Les phrases page 10, ligne 22 "Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 5..." et page 10, ligne 27 "Les mesures d'activité nitrilasique...comme décrit..." se réfèrent à d'autres documents pour les conditions de culture et les mesures d'activité nitrilasique. De même, la phrase page 12, ligne 2 "les mesures d'activité polyamide hydrolase...comme décrit dans la demande WO 97/04083..." se réfère à un autre document pour les mesures d'activité polyamide hydrolase. La demande devant être compréhensible par elle-même, les conditions ne peuvent pas être introduites par référence, elles doivent être spécifiées (Art. 5 PCT).
- f) Certains plasmides par exemple pXL2035 (page 10, ligne 19), pRPG9 et pSL301 (Exemple 11, pages 20-21), pRPA-BCAT37 (page 23, ligne 25), RSF1010D20 (page 23, ligne 27) ne sont décrits que par référence à d'autres documents. Les plasmides ne sont pas suffisamment décrits pour que la demande soit
-

compréhensible par elle-même (Art. 5 PCT).

- g) Le tableau 6 (page 22) compare deux souches différentes: DH5 α et W. Il n'est donc pas clair comment l'utilisation du locus *cer* peut améliorer la productivité (Art. 5 PCT).
- h) La souche L21 n'est pas définie, ce qui rend la description obscure (Art. 5 PCT)
- i) les expressions "de préférence" dans les revendications 5 et 9, indiquent que, respectivement, les caractéristiques "entre 0,1 et 0,3 g/l" et "entre 0,5 et 200 g/l" sont entièrement facultatives. De même, l'expression "en particulier", dans la revendication 13, indique que la caractéristique "les dérivés de protéines de pomme de terre" est entièrement facultative (Directives concernant l'examen préliminaire international III 4.6 PCT).
- j) L'expression "additifs appropriés" dans le paragraphe 2, page 6 n'est pas claire parce que n'importe quel additif peut être considéré, cela rend l'étendue de l'invention mal définie (Art. 5 PCT).
- k) Si par exemple polymérase *pfu* (page 23, lignes 18-19) et *Quiaex* (page 25 ligne 18) sont des marques déposées, le fait qu'elles ne soient pas reconnues comme telles rend la description obscure (Directives concernant l'examen préliminaire international II 4.16 PCT).
- l) L'abréviation HMTBA (tableau 1, page 11) n'est pas définie dans la description, ce qui rend cette dernière obscure (Art. 5 PCT).
- m) Les termes "représente" (page 8 ligne 31), D20 (page 9 ligne 6), "est" (page 6 ligne 32), figure 2 (page 26 ligne 16), "contant" (page 9 ligne 27) ne sont pas clairs et rendent la description obscure (Art. 5 PCT).

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

- a) Il ressort clairement de la description et de la revendication 19 que l'utilisation
-

d'un promoteur P_{trp} est essentielle à la définition de l'invention. La revendication indépendante 1, ne contenant pas cette caractéristique, ne remplit pas la condition visée à l'article 6 PCT en combinaison avec la règle 6.3 b) PCT, qui prévoient qu'une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention.

- b) Dans la revendication 14 et dans la description (par exemple: page 7, ligne 6) le promoteur P_{trp} n'est pas défini. L'origine du promoteur n'étant pas spécifiée, la revendication 14 et la description ne sont pas claires (Art. 5 et 6 PCT).
- c) Dans la revendication 4 le terme "forte" utilisé dans la revendication ayant un sens relatif, il laisse planer un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles il se réfère. L'objet de ladite revendication n'est donc pas clairement défini (article 6 et Directives concernant l'examen préliminaire international III 4.5a PCT).

"Express Mail" mailing label
number EE617838829

Date of Deposit
-December 07, 2000-

I hereby certify that this paper or fee is
being deposited with the United States Postal
Service "Express Mail Post Office to
Addressee" service under 37CFR 1.10 on the
date indicated above and is addressed to the
Assistant Commissioner for Patents,
Washington, D.C. 20231

-Jean Marshall-

(Typed or printed name of person mailing
paper or fee)

Jean Marshall

(Signature of person mailing paper or fee)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

TETAZ, Franck
RHONE-POULENC AGRO
DPI
B.P. 9163
F-69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)

19.09.2000

Applicant's or agent's file reference
PH 98032 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/FR99/01343

International filing date (day/month/year)
08/06/1999

Priority date (day/month/year)
10/06/1998

Applicant

RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 391) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer:

Vullo, C

Tel. +49 89 2399-8061



PATENT COOPERATION TREATY



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference PH 98032 PCT	FOR FURTHER ACTION		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR99/01343	International filing date (day/month/year) 08/06/1999	Priority date (day/month/year) 10/06/1998	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/55			
Applicant RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE et al.			

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 11 sheets including this title page.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application 	

Date of submission of the demand 06/01/2000	Date of completion of this report 19.09.2000
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer: Surdej, P Telephone No. +49 89 2399 7334 



I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments.)*:

Description, pages:

1-27 as originally filed

Claims, No.:

1-20 as originally filed

Drawings, sheets:

1/4-4/4 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages:

☐ the claims, Nos.:

☐ the drawings, sheets:

3. ☐ The present report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated as follows (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

☐ restricted the claims.

☐ paid additional fees.

☐ paid additional fees under protest.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR99/01343

☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict the claims or pay additional fees.

3. This Authority found that, according to Rules 13.1, 13.2 and 13.3:

☐ the requirement of unity of invention is complied with.

☒ the requirement of unity of invention is not complied with, for the following reasons:

see separate sheet

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

☒ all parts.

☐ the parts relating to claims Nos.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes:	Claims	5-6,9,12-15,18-20
	No:	Claims	1-4,7-8,10-11,16-17
Inventive Step	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-20
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-20
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet



VIII. Certain observations in the international application

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Reference is made to the following documents:

- D1:** LEE S.Y. AND CHANG H.N.: 'High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source' BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, September 1993 (1993-09), pages 971-974, cited in the application
- D2:** EP-A-0 596 812 (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 May 1994 (1994-05-11) cited in the application
- D3:** LEE J. ET AL.: 'Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source' BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 59-62
- D4:** EP-A-0 496 993 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 August 1992 (1992-08-05)
- D5:** WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 March 1990 (1990-03-08)
- D6:** WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 May 1998 (1998-05-07)
- D7:** WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 March 1990 (1990-03-22)
- D8:** CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 November 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVCIC, BRANKA ET AL: 'Effect of some factors

on the growth and penicillin acylase activity of
Escherichia coli ATCC 9637' & MIKROBIOLOGIJA (1968),
5(2), 189-96, 1968,

D9: FR-A-2 128 587 (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20
October 1972 (1972-10-20)

D10: US-A-5 000 000 (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM
L.O; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 March 1991 (1991-03-
19)

D11: US-A-5 354 667 (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C;
PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 October 1994
(1994-10-11)

D12: US-A-4 246 346 (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE);
LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 January
1981 (1981-01-20)

Introduction

The application discloses a process for preparing
heterologous proteins in E. coli W and corresponding
strains.

With regard to point I

Basis of the opinion

Pages 1-4 of the listing of sequences nos. 1-4, filed
on 1st July 1999, do not form part of the application
(rule 13b 1f) PCT).

With regard to point IV

Lack of unity of the invention

Claims 1-18 relate to an industrial process for preparing heterologous proteins in an E.coli strain W. Claims 19-20 relate to an E. coli strain W, characterized in that it comprises a system for expressing heterologous proteins, in which the promoter is the P_{trp} promoter. The independent claims 1 and 19 are not mutually linked in such a way that they form a single general inventive concept (rule 13.1 PCT), this being for the following reasons:

The technical characteristics of these claims, namely an E.coli strain W and a system for expressing heterologous proteins, and their combination (see point V2), are already known and do not involve an inventive step. The demand for unity of the invention (rule 13.1 PCT) is not therefore observed, since no technical relationship relating to one or more "specific technical elements" in the sense of rule 13.2 PCT exists between the independent claims.

With regard to point V

Recent statement according to Article 35 (2) regarding the novelty, inventive step and industrial



applicability; citations and explanations supporting this statement

2) Novelty (Art. 33.1 and 2)

Claims 1-3 are not novel if document **D4** is considered. A system for expressing a heterologous protein (GI-7-ACA acyclase) is used in the E. coli strain W ATCC 9637 (example 9, page 14, lines 26-27 and 51, and claim 4). In addition, a derivative of the E. coli strain W ATCC 9637 is obtained by clonal selection and genetic manipulation (page 14, lines 49-50).

Claim 4 is not novel in light of **D4**. A high content of heterologous proteins (page 15, line 4) and a high density of biomass (page 15, lines 29-32) are produced.

Claims 7-8 are not novel since document **D4** mentions the use of sucrose for preparing the culture medium (page 8, line 44). In addition, the E. coli strain W ATCC 9637 is well known for its capacity to use sucrose, **D5** (page 6, lines 33-36), **D1** (page 971, introduction), **D10** (column 6, lines 49-53).



When D4 is considered claims 10-11 are not novel.
Specifically, nitrogen sources such as yeast
extracts are mentioned (page 15, line 23).

Claims 16-17 are not novel since GI-7-ACA
acyclase, disclosed in document D4, is an enzyme
(for example: page 9, line 16).

3) Inventive step (Art. 33.1 and 3)

Claims 5-6 are novel, but they are not inventive.
Specifically, the tryptophan promoter is known
when the state of the prior art is considered (**D2**:
page 11, line 24 and **D6**: page 25, line 5), and in
these cases, the tryptophan is added to the medium
(**D2**: page 11, line 42 and **D6**: page 25, line 11).
The amounts of tryptophan added are conventionally
0.1 g/l. Since the description does not mention
that the concentrations of tryptophan given in
claim 6 present any advantage, this claim does
not, therefore, have an inventive step.

Claim 9 appears to be novel since document D4 does
not mention a specific amount, but it is not
inventive since documents D1, **D3** and D5 give the
amounts, 20 g/l (page 972, materials and
processes), 15 g/l (materials and processes) and

2% (page 19, line 43), respectively, added to the culture medium for E. coli W ATCC 9637.

Claims 12-13 are novel, but do not have an inventive step since meat proteins or peptones are very often envisaged as alternatives to other nitrogen sources (D11: column 8, line 53, D9: page 7, line 15, D12: column 3, line 16 and table II). In particular in D8, the growth of the E. coli strain W ATCC 9637 is increased in the presence of peptones. In addition, the concentration ranges given in claim 12 are sufficiently broad to be covered by common organic nitrogen sources such as peptones, yeast extracts, etc.

Claims 14-15 and 19-20 are novel, but do not contain an inventive step since document D7 (page 13, paragraph 3) discloses a sequence which is 93.4% identical to that described in the application. In particular, the sequences of the P_{trp} promoter and of the ribosome binding site of the phage cII gene appear to be entirely conserved. The combination of the P_{trp} promoter with the E. coli strain W is, therefore, obvious in the light of documents D4 and D7.

Claim 18 is novel, but it shows no inventive step

when D2 and D6 are considered in combination with D4. Documents D2 (page 11, line 24) and D6 (page 25, line 5) relate to the expression of nitrilase under the control of the tryptophan promoter in E. coli TG1 (D2: example 5) and DH5 α (D6: example 5). The choice of the E. coli strain W ATCC 9637 is obvious since this strain can use sucrose, in particular if consideration is given to the fact that the E. coli strain W ATCC 9637 is well known for its capacity to use sucrose, D5 (page 6, lines 33-36), D1 (page 971, introduction) and D10 (column 6, lines 49-53), whereas other strains of E. coli commonly used cannot (for example, see document D5: page 20, line 9).

With regard to point VII

Irregularities in the international application

- a) Contrary to that demanded by rule 5.1 a) ii) PCT, the description does not mention the relevant state of the prior art set out in documents D3-D5, D7-D12, and does not cite these documents.
- b) The definition of the expression "heterologous protein" is not clear. Specifically, the phrase, page 7, lines 31-33, "or a protein naturally produced ... regulation ... different from those

of the expression system according to the invention" is contradictory to the phrase, page 7, lines 25-27, "The term heterologous protein is intended to mean ..." which affirms that a heterologous protein is a protein which is not found naturally in E. coli W. In addition, if the expression of the heterologous protein is controlled by regulation elements different from those of the expression system according to the invention, the description goes beyond what is claimed (Art. 5 PCT).

c) The phrase, page 7, lines 22-24, "the genes whose coexpression promotes ... are included in the expression system according to the invention" appears to suggest that the description goes beyond the claims by introducing a characteristic which is not sufficiently defined, thereby making the description obscure (Art. 5 PCT).

d) In the description, concerning documents "CIP application no 08/194,588" (page 7, line 13) and "application FR96/13077" (page 9, lines 29-31), it is not clear which of the documents the applicant is referring to. Consequently, certain characteristics of the invention are not clear and it is not possible to determine whether the

invention can be executed by a person skilled in the art (Art. 5 PCT).

- e) The phrases, page 10, line 22, "Expression cultures were prepared as described in example 5..." and, page 10, line 27, "The measurements of nitrilase activity...as described..." refer to other documents for the culture conditions and the nitrilase activity measurements. Similarly, the phrase, page 12, line 2, "the measurements of polyamide hydrolase activity...as described in application WO 97/04083..." refers to another document for the measurements of polyamide hydrolase activity. Since the application must be understandable by itself, the conditions cannot be introduced by way of reference, they must be specified (Art. 5 PCT).
- f) Certain plasmids, for example pXL2035 (page 10, line 19), pRPG9 and pSL301 (example 11, pages 20-21), pRPA-BCAT37 (page 23, line 25) and RSF1010D20 (page 23, line 27) are described only by way of reference to other documents. The plasmids are not sufficiently described for the application to be understandable by itself (Art. 5 PCT).

-
- g) Table 6 (page 22) compares two different strains: DH5 α and W. It is not, therefore, clear how the use of the cer locus can improve the productivity (Art. 5 PCT).
- h) The strain L21 is not defined, thereby making the description obscure (Art. 5 PCT)
- i) The expressions "preferably" in claims 5 and 9, indicate that the characteristics "between 0.1 and 0.3 g/l" and "between 0.5 and 200 g/l", respectively, are entirely optional. Similarly, the expression "in particular", in claim 13, indicates that the characteristic "the derivatives of potato proteins" is entirely optional (Directives relating to the International Preliminary Examination III 4.6 PCT).
- j) The expression "suitable additives" in paragraph 2, page 6, is not clear because any additive can be considered, and this makes the scope of the invention poorly defined (Art. 5 PCT).
- k) If, for example, pfu polymerase (page 23, lines 18-19) and Quiaex (page 25, line 18) are trademarks, the fact that they are not recognized as such makes the description obscure (Directives

relating to the International Preliminary
Examination II 4.16 PCT).

- 1) The abbreviation HMTBA (table 1, page 11) is not defined in the description, thereby making the latter obscure (Art. 5 PCT).

- m) The terms "reoresents" (page 8, line 31), D20 (page 9, line 6), "is" (page 6, line 32), figure 2 (page 26, line 16), "conting" (page 9, line 27) are not clear and make the description obscure (Art. 5 PCT).

With regard to point VIII

Observations relating to the International Application

- a) It emerges clearly from the description and from claim 19 that the use of a P_{trp} promoter is essential to the definition of the invention. The independent claim 1, which does not contain this characteristic, does not satisfy the condition pursuant to Article 6 PCT in combination with Rule 6.3b) PCT, which holds that an independent claim must contain all the technical characteristics essential to the definition of the invention.

- b) In claim 14 and in the description (for example: page 7, line 6), the P_{trp} promoter is not defined. Since the origin of the promoter is not specified, claim 14 and the description are not clear (Art. 5 and 6 PCT).
- c) In claim 4, since the term "high" used in the claim has a relative sense, it allows some doubt to remain with regard to the meaning of the technical characteristics to which it refers. The subject-matter of said claim is not, therefore, clearly defined (Article 6 and Directives concerning the International Preliminary Examination III 4.5a PCT).

*Domestic Mail® mailing label

number EE 617828829

Date of Deposit

Dec 7, 2000

I hereby certify that this paper or fee is
being deposited with the United States Postal
Service for mailing to the
Address of the addressee on the
envelope or other container attached to the
Article of Mailing for Mailing,
Washington, D.C. 20231

Jean Marshall

(Typed or printed name of person mailing

paper or fee)

Jean Marshall

(Signature of person mailing paper or fee)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/01343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/55 C12N9/78 C12N9/80 C12N15/71 C12N1/21 C12P21/02 //(C12N1/21,C12R1:19)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE S. Y. ET CHANG H. N.: "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 15, no. 9, September 1993 (1993-09), pages 971-974, XP002094347 cited in the application	1-4, 7-10,16, 17
Y	the whole document --- -/--	5,6, 14-20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
° Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*G* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">5 October 1999</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">05. 11. 99</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Macchia, G</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01343

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 596 812 A (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 May 1994 (1994-05-11) cited in the application abstract page 3, line 20-24 page 11, line 24-46 page 12, line 44,45 page 13; table 4 page 25 -page 28; claims ---	5,6, 14-20
X	LEE J. ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 59-62, XP002094348 the whole document ---	1-4,7-10
X	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 August 1992 (1992-08-05) page 7, line 8-22 page 8, line 30 -page 9, line 12 page 13, line 38 -page 15, line 32; example 9 page 21; claim 4 ---	1-4,7, 10-13, 16,17
X	WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 March 1990 (1990-03-08) page 6, line 29-36 page 18, line 7-21; example 8 page 19, line 42 -page 23 page 26 -page 28; claims ---	1-4, 7-13,16, 17
X	US 5 354 667 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 October 1994 (1994-10-11) column 6, line 4-11 column 7; table 1 column 8, line 49-59 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
X	EP 0 670 370 A (AJINOMOTO CO. INC. (JP); ONO E.; TSUJIMOTO N.; MATSUI K.; KURAHASHI O.) 6 September 1995 (1995-09-06) page 3, line 58 -page 5, line 9 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
A	WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 May 1998 (1998-05-07) abstract page 6, paragraph 2 page 21, line 10 -page 26, line 15; examples 4,5 ---	5,6,14, 18
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: nal Application No
PCT/FR 99/01343

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 March 1990 (1990-03-22) figure 7	15,20
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 November 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVIC, BRANKA ET AL: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" XP002117599 abstract & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968,	11-13
A	--- FR 2 128 587 A (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 October 1972 (1972-10-20) page 7, line 38 -page 8, line 35; example 2	11-13
A	--- US 5 000 000 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 March 1991 (1991-03-19) column 16; example 8	11-13
A	--- US 4 246 346 A (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 January 1981 (1981-01-20) column 2, line 59 -column 3, line 20 -----	11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interr. Application No

PCT/FR 99/01343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0596812 A	11-05-1994	FR 2694571 A BR 9305280 A CA 2103616 A DE 69314280 D DE 69314280 T ES 2108850 T JP 7051070 A MX 9304825 A SG 48047 A US 5629190 A US 5635391 A	11-02-1994 28-06-1994 11-02-1994 06-11-1997 05-02-1998 01-01-1998 28-02-1995 31-05-1994 17-04-1998 13-05-1997 03-06-1997
EP 0496993 A	05-08-1992	IT 1252308 B AT 137535 T CA 2058216 A DE 69119216 D DE 69119216 T ES 2086470 T IE 75201 B JP 2851021 B JP 5211890 A US 5424196 A	08-06-1995 15-05-1996 22-06-1992 05-06-1996 05-09-1996 01-07-1996 27-08-1997 27-01-1999 24-08-1993 13-06-1995
WO 9002193 A	08-03-1990	US 5000000 A CA 1335430 A EP 0431047 A JP 5502366 T US 5554520 A US 5482846 A US 5028539 A US 5821093 A US 5916787 A US 5424202 A US 5487989 A	19-03-1991 02-05-1995 12-06-1991 28-04-1993 10-09-1996 09-01-1996 02-07-1991 13-10-1998 29-06-1999 13-06-1995 30-01-1996
US 5354667 A	11-10-1994	ES 2020792 A AT 151461 T DE 69125541 D DE 69125541 T DK 469919 T EP 0469919 A GR 3023866 T JP 6090746 A	16-09-1991 15-04-1997 15-05-1997 13-11-1997 21-07-1997 05-02-1992 30-09-1997 05-04-1994
EP 0670370 A	06-09-1995	JP 7203980 A BR 9500052 A CN 1128295 A US 5573945 A	08-08-1995 03-10-1995 07-08-1996 12-11-1996
WO 9818941 A	07-05-1998	FR 2755143 A AU 4951397 A CZ 9901454 A EP 0934419 A	30-04-1998 22-05-1998 11-08-1999 11-08-1999
WO 9002800 A	22-03-1990	AT 98693 T AU 620925 B AU 4317189 A CN 1041181 A	15-01-1994 27-02-1992 02-04-1990 11-04-1990

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/01343

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 596 812 A (RHONE-POULENC CHIMIE (FR); PETRE D; CERBELAUD E; LEVY-SCHIL S; CROUZET) 11 May 1994 (1994-05-11) cited in the application abstract page 3, line 20-24 page 11, line 24-46 page 12, line 44,45 page 13; table 4 page 25 -page 28; claims ---	5,6, 14-20
X	LEE J. ET AL.: "Fed-batch culture of Escherichia coli W by exponential feeding of sucrose as a carbon source" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 59-62, XP002094348 the whole document ---	1-4,7-10
X	EP 0 496 993 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CAMBIAGHI S.; TOMASELLI S.; VERGA R.) 5 August 1992 (1992-08-05) page 7, line 8-22 page 8, line 30 -page 9, line 12 page 13, line 38 -page 15, line 32; example 9 page 21; claim 4 ---	1-4,7, 10-13, 16,17
X	WO 90 02193 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O.; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 8 March 1990 (1990-03-08) page 6, line 29-36 page 18, line 7-21; example 8 page 19, line 42 -page 23 page 26 -page 28; claims ---	1-4, 7-13,16, 17
X	US 5 354 667 A (ANTIBIOTICOS S.P.A. (IT); CROUX C; PEREZ JC; FUENTES JLB; MALDONADO FS) 11 October 1994 (1994-10-11) column 6, line 4-11 column 7; table 1 column 8, line 49-59 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
X	EP 0 670 370 A (AJINOMOTO CO. INC. (JP); ONO E.; TSUJIMOTO N.; MATSUI K.; KURAHASHI O.) 6 September 1995 (1995-09-06) page 3, line 58 -page 5, line 9 ---	1-4,7, 10-14, 16,17,19
A	WO 98 18941 A (RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE (FR); FAVRE-BULLE O; PIERRARD J ET AL.) 7 May 1998 (1998-05-07) abstract page 6, paragraph 2 page 21, line 10 -page 26, line 15; examples 4,5 ---	5,6,14, 18
	-/--	



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01343

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 02800 A (FARMITALIA CARLO ERBA SRL (IT); BERGONZONI; ISACCHI; SARMIENTOS; CAUET) 22 March 1990 (1990-03-22) figure 7	15,20
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 21, 24 November 1969 (1969-11-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 100408, DEVIC, BRANKA ET AL: "Effect of some factors on the growth and penicillin acylase activity of Escherichia coli ATCC 9637" XP002117599 abstract & MIKROBIOLOGIJA (1968), 5(2), 189-96, 1968,	11-13
A	--- FR 2 128 587 A (ASAHI KASEI KOGYO K.K. (JP)) 20 October 1972 (1972-10-20) page 7, line 38 -page 8, line 35; example 2	11-13
A	--- US 5 000 000 A (UNIVERSITY OF FLORIDA (US); INGRAM L.O; CONWAY T.; ALTERTHUM F.) 19 March 1991 (1991-03-19) column 16; example 8	11-13
A	--- US 4 246 346 A (AKTIEBOLAGET FERMENTA (SE); LARSSON P.-O.; MOSBACH K.H.; OHLSON S.A.) 20 January 1981 (1981-01-20) column 2, line 59 -column 3, line 20 -----	11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01343

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0596812	A	11-05-1994	FR 2694571 A	11-02-1994
			BR 9305280 A	28-06-1994
			CA 2103616 A	11-02-1994
			DE 69314280 D	06-11-1997
			DE 69314280 T	05-02-1998
			ES 2108850 T	01-01-1998
			JP 7051070 A	28-02-1995
			MX 9304825 A	31-05-1994
			SG 48047 A	17-04-1998
			US 5629190 A	13-05-1997
			US 5635391 A	03-06-1997
EP 0496993	A	05-08-1992	IT 1252308 B	08-06-1995
			AT 137535 T	15-05-1996
			CA 2058216 A	22-06-1992
			DE 69119216 D	05-06-1996
			DE 69119216 T	05-09-1996
			ES 2086470 T	01-07-1996
			IE 75201 B	27-08-1997
			JP 2851021 B	27-01-1999
			JP 5211890 A	24-08-1993
			US 5424196 A	13-06-1995
WO 9002193	A	08-03-1990	US 5000000 A	19-03-1991
			CA 1335430 A	02-05-1995
			EP 0431047 A	12-06-1991
			JP 5502366 T	28-04-1993
			US 5554520 A	10-09-1996
			US 5482846 A	09-01-1996
			US 5028539 A	02-07-1991
			US 5821093 A	13-10-1998
			US 5916787 A	29-06-1999
			US 5424202 A	13-06-1995
			US 5487989 A	30-01-1996
US 5354667	A	11-10-1994	ES 2020792 A	16-09-1991
			AT 151461 T	15-04-1997
			DE 69125541 D	15-05-1997
			DE 69125541 T	13-11-1997
			DK 469919 T	21-07-1997
			EP 0469919 A	05-02-1992
			GR 3023866 T	30-09-1997
			JP 6090746 A	05-04-1994
EP 0670370	A	06-09-1995	JP 7203980 A	08-08-1995
			BR 9500052 A	03-10-1995
			CN 1128295 A	07-08-1996
			US 5573945 A	12-11-1996
WO 9818941	A	07-05-1998	FR 2755143 A	30-04-1998
			AU 4951397 A	22-05-1998
			CZ 9901454 A	11-08-1999
			EP 0934419 A	11-08-1999
WO 9002800	A	22-03-1990	AT 98693 T	15-01-1994
			AU 620925 B	27-02-1992
			AU 4317189 A	02-04-1990
			CN 1041181 A	11-04-1990



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9002800 A		DE 68911461 D	27-01-1994
		DE 68911461 T	19-05-1994
		DK 120290 A	16-07-1990
		EP 0363675 A	18-04-1990
		EP 0396664 A	14-11-1990
		ES 2061855 T	16-12-1994
		JP 2888575 B	10-05-1999
		JP 3501855 T	25-04-1991
		NZ 230621 A	25-06-1992
		PT 91719 A,B	30-03-1990
		US 5352589 A	04-10-1994
		YU 179489 A	31-10-1991
FR 2128587 A	20-10-1972	JP 49011435 B	16-03-1974
		JP 48039693 A	11-06-1973
		JP 51005479 B	20-02-1976
		DE 2209591 A	14-09-1972
US 5000000 A	19-03-1991	CA 1335430 A	02-05-1995
		EP 0431047 A	12-06-1991
		JP 5502366 T	28-04-1993
		WO 9002193 A	08-03-1990
		US 5482846 A	09-01-1996
		US 5821093 A	13-10-1998
		US 5916787 A	29-06-1999
		US 5424202 A	13-06-1995
		US 5487989 A	30-01-1996
		US 5554520 A	10-09-1996
		US 5028539 A	02-07-1991
US 4246346 A	20-01-1981	NONE	

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/FR99/01343

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) PH 98032 PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION Industrial method for producing heterologous proteins in E. COLI and strains useful for said method

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE
42 Avenue Aristide Briand
92160 ANTONY
France

☐ This person is also inventor.

Telephone No.
04.72.85.25.92

Facsimile No.
04.72.85.28.43

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

FR

State (that is, country) of residence:

FR

This person is applicant
for the purposes of:all designated
Statesall designated States except
the United States of Americathe United States
of America onlythe States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PIERRARD Jérôme
3 Rue Hector Berlioz
69009 LYON
FRANCE

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

FR

State (that is, country) of residence:

FR

This person is applicant
for the purposes of:all designated
Statesall designated States except
the United States of Americathe United States
of America onlythe States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:



agent



common representative

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

TETAZ Franck
RHONE-POULENC AGRO
14/20 Rue Pierre Baizet
69009 LYON FRANCE

Telephone No.
03.72.85.25.92

Facsimile No.
03.72.85.28.43

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. 3 FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GUITTON Carole
23 Rue du Petit Montessuy
69009 LYON
FRANCE

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

FR

State (that is, country) of residence:

FR

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

FAVRE-BULLE Olivier
113 Rue Baraban
69003 LYON
FRANCE

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

FR

State (that is, country) of residence:

FR

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATIONS OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes: at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☒ ZA SOUTH AFRICA
- ☐
- ☐

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM				
<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box				
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 10 June 1998 (10.06.98)	98/07,474	FRANCE		
item (2)				
item (3)				
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):				
<i>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(iii)) See Supplemental Box</i>				
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen, the two-letter code may be used):		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):		
ISA /		Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)		
Box No. VIII CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING				
This international application contains the following number of sheets:		This international application is accompanied by the item(s) marked below:		
request : 4		1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet Fee slip		
description (excluding sequence listing part) : 27		2. <input checked="" type="checkbox"/> separate signed power of attorney (3)		
claims : 2		3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any:		
abstract : 1		4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature		
drawings : 4		5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):		
sequence listing part of description : 4		6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language):		
Total number of sheets : 42		7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material		
		8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		
		9. <input type="checkbox"/> other (specify):		
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application:		
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT				
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).				
(signature) TETAZ Franck				

1. Date of actual receipt of the purported international application: 8 JUNE 1999		2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /		
6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.		

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	For International Bureau use only
---	-----------------------------------

Enclose this mailing label

number EE 6178388-29

Date of Deposit Dec 7, 2000

I hereby certify that this paper or fee is
being deposited with the United States Postal
Service at the Post Office to
provide service under 37 CFR 1.10 on the
date indicated above and is addressed to the
Assistant Commissioner for Patents,
Washington, D.C. 20231

John M. Marshall
(Typed or printed name of person mailing
paper or fee)

John M. Marshall
(Signature of person mailing paper or fee)